(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 426**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01) ***A61K 47/48*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) ***C07K 16/30*** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) ***C12N 1/21*** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) ***C12N 15/63*** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) ***G01N 33/574*** (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05852645 .0**
(96) Fecha de presentación : **30.11.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1827492**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

(54) Título: **Anticuerpos dirigidos a GPNMB y sus aplicaciones.**

(30) Prioridad: **30.11.2004 US 632023 P**
07.11.2005 US 733779 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

(73) Titular/es: **CELLDEX THERAPEUTICS, Inc.**
119 Fourth Avenue
Needham, Massachusetts 02494, US
AMGEN FREMONT Inc.

(72) Inventor/es: **Rastelli, Luca;**
Jia, Xiao-Chi;
Mezes, Peter;
Liang, Meina;
Pollack, Vincent, A.;
Herrmann, John;
Ara, Gulshan;
Karkaria, Cyrus;
Lichensten, Henri;
Torgov, Michael;
Xiao, Feng;
Jeffers, Michael, E.;
Larochelle, William, J.;
Chapoval, Andrei;
Davagnino, Juan;
Foord, Orit;
Klakamp, Scott y
Tse, Kam, Fai

(74) Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos con especificidad por GPNMB y a usos de dichos anticuerpos. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen específicamente a GPNMB y usos de los mismos. Se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, particularmente secuencias correspondientes a secuencias de cadenas pesadas y ligeras contiguas que se extienden por las regiones marco y/o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La presente invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden anticuerpos dirigidos contra GPNMB y procedimientos de uso de dichos inmunoconjugados. La presente invención proporciona además anticuerpos biespecíficos que comprenden un componente de anticuerpo dirigido contra GPNMB y un componente dirigido contra CD3, y procedimientos de uso de tales anticuerpos biespecíficos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

GPNMB

Se identificó una glicoproteína transmembrana posible llamada "*nmb*" (nº de registro X76534 EMBL), denominada en lo sucesivo en este documento GPNMB, y se describió por Weterman y col., (Int J Cancer 60:73-81, 1995) como diferencialmente expresada en líneas celulares de cáncer de melanoma humano de baja metástasis y xenoinjertos en comparación con una línea celular de melanoma más agresiva. GPNMB comparte el 33% de identidad con el precursor de la proteína específica de melanocitos pMe117 (Kwon y col., 1991, PNAS 88:9228-9232). GPNMB tiene el 71% de homología con una proteína transmembrana asociada a células dendríticas, DC-HIL (Shikano y col., 2001 Biol. Chem. 276:8125-8134). GPNMB también es conocida como la proteína neurocinina 1 inducible del factor de crecimiento hematopoyético HGFIN (Bandari y col., Reg. Peptides 111:169-178) y la osteoactivina de genes relacionados con los huesos (Owen y col. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2003, 13(2-4):205-220),

Se ha descrito un antisuero dirigido contra GPNMB de conejo y dos hibridomas murinos específicos para la proteína GPNMB (Kuan Chien-Tsun y col. (2003) Proc Am Assoc Cancer Res Annual Meeting 44:1116-1117).

También se informó que nmb podría reducir el potencial metastásico de una línea celular de melanoma negativa para nmb altamente metastásica (Weterman, 1995). GPNMB se consideró una candidata a marcador de tumores de glioblastoma tras la extracción e identificación de la expresión mediante el análisis de bases de datos públicas (Loging y col., 2000, Genome Research 10:1393-1402). Este gen se encontró sobreexpresado en tumores de pulmón (publicación de patente de EE.UU. nº US20030064947), además de cánceres de mama, rectal y de colon (publicación de patente de EE.UU. nº US2003100720). Los datos de NCBI SAGE también muestran la sobreexpresión de este gen en carcinoma de estómago y pancreático. Se ha mostrado que el ortólogo de ratón está muy regulado por exceso en una línea NSC de neurocitoblastos derivada del modelo de genes inactivados TSC2 para el síndrome de complejo de esclerosis tuberosa (publicación internacional nº WO 2003/080856).

Anticuerpos

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son normalmente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) y dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción del extremo carboxi de la cadena L y H tiene uno y tres o cuatro dominios constantes, respectivamente, que son principalmente responsables de la función efectora. Hay dos tipos de cadenas L humanas clasificadas como kappa y lambda. Las cadenas H se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante que define el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Los isotipos pueden dividirse adicionalmente en subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Las inmunoglobulinas pueden producirse naturalmente in vivo por linfocitos B. Cada clon de células B produce un anticuerpo con un receptor de antígeno que tiene una estructura de unión a antígeno posible única. El repertorio de receptores de antígenos, aproximadamente 107 posibilidades, existe in vivo antes de la estimulación de antígenos. Esta diversidad se produce por recombinación somática, es decir, la unión de diferentes segmentos de genes de anticuerpos. La cadena H, la cadena L kappa y la cadena L lambda de la inmunoglobulina están codificadas por tres loci genéticos separados y cada locus tiene múltiples copias de al menos 3 tipos de segmentos de genes que codifican regiones variables (V), constantes (C) y de unión (J), los genes de la cadena pesada también incluyen una región de diversidad (D). La selección de regiones V, C y J específicas (y D para la cadena pesada) de entre los diversos segmentos de genes disponibles (45 V de cadena pesada; 35 V kappa; 23 D de cadena pesada; 6 J de cadena pesada; 5 J kappa) genera aproximadamente 1011 posibles especificidades de secuencias de la línea germinal presentadas en células B. La unión de las de regiones V, C y J puede producir la pérdida o adición de restos en las uniones. La región V de las cadenas L y H de anticuerpos humanos está constituida por regiones marco (FR) relativamente conservadas que forman un andamiaje para tres regiones hipervariables también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Desde el extremo amino de tanto la cadena pesada como la ligera, el dominio V está compuesto por regiones FR y CDR en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3. La unión del dominio V con un

dominio D (sólo la cadena pesada) y J añade CDR3-FR4. Las CDR son generalmente responsables de la unión a antígeno.

La especificidad de los anticuerpos monoclonales ha hecho que sean agentes atractivos para elegir como diana cáncer in vivo con la esperanza de erradicar la enfermedad, a la vez que se ahorra tejido normal. La solución que inicialmente utilizó anticuerpos monoclonales de ratón ha encontrado limitaciones a la posible eficacia tales como inmunogenicidad; funciones efectoras ineficaces y semivida corta in vivo. Las tecnologías se desarrollaron para: anticuerpos quiméricos que buscan utilizar los dominios variables de unión a antígeno de anticuerpos monoclonales de ratón combinados con las regiones constantes de anticuerpos humanos (Boulianne y col. 1984 Nature 313:643-646; Morrison y col., 1984 PNAS USA 81:6851-6855); anticuerpos humanizados que injertaron regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de unión a antígeno de anticuerpos de ratón en inmunoglobulina humana (Jones y col., 1986 Nature 321: 522-525; Riechmann y col., 1988 Nature 332:323-327; Verhoeyen y col., 1988 Science 239:1534-1536; Vaughan y col., 1998 Nature Biotechnol. 16:535-539); y bibliotecas de expresión en fago de fragmentos scFv o Fab monocatenarios de anticuerpos (de Haard y col., 1999 J Biol. Chem. 274: 18218-18230; Knappik y col., 2000 J. Mol. Biol. 296:57-86; Sheets y col., 1998 PNAS USA 95:6157-6162; Vaughan y col., 1994 Nature Biotechnol 14: 309-314, 1996; Griffiths y col. EMBO J. 13:3245-3260). Adicionalmente se han desarrollado animales transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina humana y genes endógenos no funcionales para la inmunización y la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (Fishwild y col., 1996 Nature Biotechnol 14:845-851; Mendez y col., 1997 Nature Genet. 15:146-156; Nicholson y col., 1999 J. Immunol 163, 6898-6906).

Anticuerpos monocatenarios: Los anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) se describieron por primera vez a finales de los años 80 (Bird y col., Science 242:423-426 (1988); Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)). Se usa un enlazante de polipéptidos, que normalmente oscila en longitud de 5 a 27 restos de aminoácidos, para unir el extremo C del dominio variable de cadena ligera (V_L) al extremo N del dominio variable de cadena pesada (V_H). Alternativamente, el enlazante une el extremo C de V_H al extremo N de V_L. Ambas formas (V_L-V_H y V_H-V_L) se han usado satisfactoriamente en la bibliografía. El enlazante más común usado en la bibliografía es el enlazante de 15 aminoácidos $(Gly_4Ser)_3$, sin embargo hay varios otros enlazantes que se han utilizado que incluyen un enlazante de 25 aminoácidos llamado 205C (Pantoliano y col., Biochemistry 30:10117-10125 (1991)). Los anticuerpos monocatenarios están actualmente en ensayo clínico; uno de los más avanzados es h5G1.1 o pexelizumab. Este scFv es específico para el complemento C5 humano y está siendo usado en ensayos clínicos para pacientes cardiacos sometidos a cirugía de derivación cardiopulmonar (Shernan y col., Ann. Thorac Surg. 77:942-949 (2004)).

Anticuerpos biespecíficos (bi-Ab): Un área de la investigación de mAb en la que se ha hecho un progreso considerable es en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos (bi-Ab). Hay distintas ventajas en el desarrollo de moléculas de anticuerpos terapéuticos con especificidad dual. Por ejemplo, los bi-Ab pueden servir de mediadores para elegir como diana células efectoras inmunitarias tales como CTL para células no deseadas (Baeuerle y col., Curr. Opin. Mol. Ther. 5:413-419 (2003)). En otro ejemplo, los anticuerpos biespecíficos ligados químicamente dirigidos contra receptores gamma Fc CD16, CD64 y CD89 fueron significativamente más eficaces in vitro que los anticuerpos IgG convencionales (Peipp y Valerius, Biochem. Soc. Trans. 30:507-511 (2002)). Uno de los retos en el desarrollo de bi-Ab como agentes terapéuticos viables ha sido producir cantidades suficientemente grandes de un resto estable para aplicaciones clínicas. Otro reto ha sido determinar la combinación correcta de dianas validadas y la biología subyacente que conduciría a un producto terapéutico. Para revisiones recientes sobre las dificultades experimentadas con bi-Ab véase (Kontermann, Acta Pharmacol Sin 26:1-9 (2005); Peipp y Valerius, Soc. Trans. 30:507-511 (2002)).

Anticuerpos monocatenarios biespecíficos (bi-scFv): Un tipo notable de bi-Ab que puede prepararse es un anticuerpo monocatenario biespecífico o bi-scFv. Para una revisión sobre la generación de bi-scFv véase (Kipriyanov y Le Gall, Curr Opin Drug Discov Devel 7:233-242 (2004)). Los bi-scFv comprenden normalmente 4 dominios variables, 2 pesados (VH) y 2 ligeros (VL), que se derivan de 2 anticuerpos diferentes. Los 4 dominios están ligados junto con 3 enlazantes cortos que oscilan en longitud de 5-27 aminoácidos. La actividad biológica de este tipo de anticuerpo depende de varias características referentes a la construcción de la molécula. Por ejemplo, pueden variar tanto las secuencias de enlazantes entre los dominios V de anticuerpos como el propio orden de los 4 dominios V de los anticuerpos (para los 2 anticuerpos), además del sistema de expresión que se usa; todo puede afectar enormemente la solubilidad y la actividad biológica de los diversos productos resultantes (Kipriyanov y col., J. Mol. Biol. 330:99-111 (2003); Le Gall y col., Protein Eng. Des. Sel. 17:357-366 (2004); Pavlinkova y col., Clin Cancer Res. 5:2613-1619 (1999)).

Linfocitos T citotóxicos: Bajo circunstancias normales, las células T se activan cuando el complejo de CD3/receptor de células T (CD3/TCR) se une a una molécula de MHC pertinente asociada a un péptido Ag específico. El ajuste de CD3/TCR con MHC produce señales intracelulares necesarias para desencadenar una respuesta inmunitaria contra un patógeno o tumor. También pueden lograrse señales similares que producen la activación de células T por anticuerpos que pueden unirse a ciertas estructuras del complejo CD3/TCR. En la bibliografía se ha mostrado que bi-Ab que reconocen tanto el complejo TCR/CD3 como el antígeno asociado a tumor (TAA) pueden desencadenar el programa de activación en CTL en presencia de células diana (Chapoval y col., J. Immunol 155:1296-1303 (1995)).

Se están utilizando tecnologías recombinantes para permitir mejoras adicionales en las moléculas de anticuerpo con el fin de potenciar la eficacia in vivo. Tales tecnologías proporcionan, por ejemplo, optimización del tamaño molecular, afinidad, farmacocinética, toxicidad, especificidad, valencia, funciones efectoras, armamento directo

e indirecto, terapia de combinación, y diversas aproximaciones a profármacos.

Se desearía tener un anticuerpo adecuado para la elección como diana in vivo de GPNMB que expresa patologías y para permitir la eficacia terapéutica.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un anticuerpo humano aislado que se une específicamente a la proteína transmembrana posible GPNMB definida por SEQ ID NO: 289, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 22, una CDR2 de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 24, una CDR3 de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 26, una CDR1 de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 31, una CDR2 de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 33 y una CDR3 de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 35. En una realización preferida, el anticuerpo comprende la región variable de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 20. En otra realización preferida, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 29. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Lo más preferentemente, el anticuerpo es Mab1.15.1.

En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra GPNMB de IgG1 pura de la invención que tienen efecto citotóxico para células que expresan por exceso GPNMB. En una realización específica, la presente invención proporciona el uso médico de dichos anticuerpos o una composición que comprende dicho anticuerpo dirigido contra GPNMB de IgG1 pura y un inmunomodulador (tal como, pero no se limita a, interferones y citocinas).

En otra realización, la presente invención proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo dirigido contra GPNMB de la invención o un fragmento del mismo, y un agente citotóxico. En una realización específica, el agente citotóxico es auristatina E (dolastatina 10) o un derivado de la misma. Tales inmunoconjugados también se proporcionan para uso médico.

En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos que comprenden un componente dirigido contra GPNMB de la invención y un componente de anticuerpo dirigido contra CD3 que permiten la destrucción citotóxica de células tumorales diana por células T. En otra realización, la presente invención proporciona anticuerpo Fv monocatenario de la invención conjugado a un agente citotóxico. En una realización específica, el agente citotóxico es auristatina E (dolastatina 10) o un derivado de la misma. Tales anticuerpos biespecíficos y anticuerpos Fv monocatenarios conjugados también se proporcionan para uso médico.

Se proporcionan secuencias de aminoácidos para anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra GPNMB de la invención y secuencias de ácidos nucleicos que los codifican.

Se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos dirigidos contra GPNMB humanos, que incluyen composiciones terapéuticas que comprenden los mismos, y usos de los mismos. Particularmente se proporcionan inmunoconjugados terapéuticos que comprenden anticuerpos dirigidos contra GPNMB y un agente citotóxico o citostático para tratar GPNMB que expresa cánceres y otros trastornos relacionados con GPNMB. También se proporcionan pautas de dosificación.

Aspectos adicionales de la divulgación se expondrán en parte en la siguiente descripción, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Inhibición y regresión completa del crecimiento tumoral de xenoinjertos SK-MEL-2 en ratones atímicos después del tratamiento con 2,50 a 20 mg/kg i.v. cada 4 días durante 4 tratamientos. También se muestran las respuestas de animales que tenían tumores a fármacos de referencia tales como vinblastina (1,7 mg/kg i.v. q4d X4) y paclitaxel (24 mg/kg i.v. q2d X4). Los grupos de control se tratan con o bien solución salina tamponada con fosfato (PBS) o bien solución salina fisiológica.

Figura 2: Destrucción indirecta de inmunotoxinas de células de melanoma UACC-62 por anticuerpos dirigidos contra GPNMB

Figura 3: Inhibición de la formación de colonias de células UACC-62 incubadas con anticuerpos dirigidos contra GPNMB conjugados con auristatina E (AE).

Figura 4: Inhibición y regresión completa del crecimiento tumoral de xenoinjertos SK-MEL-2 en ratones atímicos después del tratamiento con CR011-vcMMAE 5,0 mg/kg i.v. cada 4 días durante 4 tratamientos. La falta de respuestas de animales que tenían tumores a CR011 sin conjugar o a monometilauristatina E libre demuestra que el inmunoconjugado intacto es esencial para efectos antitumorales.

Figura 5: Reducción y regresión completa del tamaño del tumor de xenoinjertos SK-MEL-2 en ratones atímicos después del tratamiento con 1,25 a 20 mg/kg i.v. cada 4 días durante 4 tratamientos. También se muestran las respuestas de animales que tenían tumores a fármacos de referencia tales como vinblastina (1,7 mg/kg i.v. q4d X4) y paclitaxel (24 mg/kg i.v. q2d X4). Los grupos de control se tratan con o bien solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina fisiológica.

Figura 6: Perfil de concentración en suero-tiempo del anticuerpo de CR011-vcMMAE después de la administración intravenosa de 1 y 10 mg/kg a ratones atímicos. La detección se logró con un ensayo de ELISA tipo sándwich que empleó el antígeno de CR011 (CG56972, GPNMB) y anticuerpos dirigidos contra globulinas humanas conjugados con peroxidasa de rábano picante. Los resultados mostrados son las concentraciones en suero expresadas como µg/mL (eje x izquierdo) y la concentración micromolar (eje x derecho).

Figura 7: Se registraron respuestas globales expresadas como curaciones en porcentaje para animales experimentales tratados con 5 intervalos de dosificación graduados diferentes (es decir, 0, 1, 4, 8 y 16 días entre tratamientos). La pendiente de la línea no es significativamente diferente de 0 ($p < 0{,}2904$).

Figura 8: Proporciones de regresores completos en función del intervalo de dosificación y estatificados por dosis acumulada. Para cada grupo, n= 6 ratones/grupo. Ratones atímicos que tenían implantes tumorales SK-MEL-2 establecidos (día 14, 80 mg) se trataron i.v. con CR011-vcMMAE y se registra la incidencia de regresiones completas.

Figura 9: Efectos de la expresión ectópica de GPNMB o sensibilidad a CR011-vcMMAE. Se transfectan células HEK293 con vector vacío (vector) o plásmido que contiene GPNMB (GPNMB) como se describe en Materiales y procedimientos. A. Se preparan lisados de células a partir de las células HEK293 transfectadas y se determina la expresión de GPNMB (panel superior) o actina (panel inferior) por inmunotransferencia. Carril 1: Transfectantes de vector vacío. Carril 2: Transfectantes de GPNMB. B. Análisis por citometría de flujo de la expresión de GPNMB en células transfectadas con vector vacío o GPNMB. C. Inhibición del crecimiento in vitro de CR011-vcMMAE de células transfectadas. Se tratan células con diversas concentraciones de CR011-vcMMAE (diamantes: vector o círculos: GPNMB) o IgG2-vcMMAE (triángulos: vector o cuadrados: GPNMB) durante 96 horas. Después de un ensayo clonogénico, la fracción de supervivencia se normaliza al control sin tratar y se expresa como un porcentaje del control usando el software gráfico GraphPad Prism. Cada tratamiento se realiza por triplicado. Se muestra un gráfico representativo de dos experimentos independientes.

Figura 10: Efecto de ARNip de GPNMB sobre la expresión endógena de GPNMB y la sensibilidad a CR011-vcMMAE. Se transfectan células SK-MEL-2 con 50 nM de ARNip de control o GPNMB que elige como diana ARNip. **A**. Se preparan lisados de células a partir de las células SK-MEL-2 transfectadas 2 y 4 días post-transfección y la expresión de GPNMB (panel superior) o actina (panel inferior) se determina por inmunotransferencia. Carril 1: Transfección con vector vacío (oligofectamina). Carril 2: Transfección de ARNip de control. Carril 3: Transfección de ARNip de GPNMB. **B**. Análisis por citometría de flujo de la expresión de GPNMB 2 y 4 días después de la transfección. Se transfectan células SK-MEL-2 con vector vacío, ARNip de control o ARNip de GPNMB como se indica en Materiales y procedimientos. **C**. La inhibición del crecimiento in vitro de CR011-vcMMAE de vector vacío (diamantes), ARNip de control (círculos) o células SK-MEL-2 transfectadas con ARNip de GPNMB (triángulos) se determina por un ensayo clonogénico como se describe en Materiales y Procedimientos. La fracción de supervivencia se normaliza al control sin tratar y se expresa como un porcentaje del control usando el software gráfico GraphPad Prism. Cada tratamiento se realiza por triplicado. Se muestra un gráfico representativo de dos experimentos independientes.

Figura 11: Análisis por FACS de SK-MEL-2 con control de isotipo, IgG2 de hibridoma (B2), IgG2 recombinante (B19) e IgG1 recombinante (B16) para CG56972/GPNMB con respecto a controles de IgG2 (B2, B19) o IgG1 (control, B16).

Figura 12: **(A)** ADCC mediada por PBMC y mAb (IgG1) de células SK-MEL-2. Las funciones efectoras de ADCC se miden como se ha descrito anteriormente a 2, 5 y 10 µg/200 µl usando relaciones de diana:efector de 10, 30, 60 y 100 como se ha indicado. (B) PBMC y mAb (IgG2) no producen ADCC a células SK-MEL-2. Las funciones efectoras de ADCC se miden como se ha descrito anteriormente a 0, 2, 5 y 10 µg/200 µl usando relaciones de diana:efector de 10, 30, 60 y 100 como se ha indicado.

Figura 13: Expresión de GPNMB en líneas de células y tejidos cancerosos humanos. Análisis por RTQ-PCR de **(A)** líneas celulares de cáncer de cerebro humano o **(B)** glioma de cáncer de cerebro humano y biopsias de meduloblastoma. **(C)** Análisis de micromatrices de expresión de GPNMB en cáncer de cerebro humano y tejidos de oligodendroglioma. Se recogen tejidos o líneas celulares, se prepara ARNm y se realizan análisis de RTQ-PCR o CuraChip como se describen en Materiales y procedimientos.

Figura 14: Análisis por FACS de unión a superficie celular del mAb CR011 a GPNMB. Se marcan células SK-MEL-2, XF-498, U-118-MG, SNB-78, SF-539 y SF-268 con una concentración saturante (10 µg/ml) de mAb CR011 o IgG2 de control. El mAb unido se detecta por citometría de flujo con anticuerpo secundario de cabra dirigido contra globulinas humanas conjugado a PE como se describe en Materiales y procedimientos. MG: Media geométrica. La línea celular SF-268 es un transcrito de GPNMB negativo y se usa como control negativo.

Figura 15: Análisis de inmunotransferencia de la expresión de GPNMB en líneas celulares de cáncer de cerebro humano. Se resuelven lisados de células en geles de Tris-glicina y se transfieren a membranas. Se lleva a

cabo el análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal para GPNMB seguido de detección potenciada de la quimioluminiscencia como se describe en Materiales y procedimientos. Las puntas de flecha indican la movilidad relativa de las especies de GPNMB p100 y 120. La línea celular SF-268 es un transcrito de GPNMB negativo y se usa como control negativo.

Figura 16: Inhibición del crecimiento in vitro de CR011-vcMMAE del crecimiento de células de astrocitoma/glioblastoma. Se incuban células XF-498, SNB-78, U-118-MG, SF-539, LOXIMVI y SF-268 con la concentración indicada de CR011-vcMMAE. También se incuban células con mAb PK16.3 de control (datos mostrados en la Tabla 1) como se describe en Materiales y procedimientos. Se determinó el crecimiento celular por ensayo clonogénico. Las colonias supervivientes se cuentan y se representan usando el software gráfico GraphPad Prism. El experimento se realiza en pocillos por triplicado y se repite dos veces. Se muestra un experimento representativo. Las CI50 para la destrucción de células se presentan en concentraciones de ng/ml. Las líneas celulares LOXIMVI y SF-268 son transcritos de CG56972 negativos y se usan como controles negativos.

Figura 17: Desarrollo de anticuerpos CR011 manipulados genéticamente. Cuatro dominios variables (V) de anticuerpos (mostrados en C para el bi-scFv) se derivan de los dominios variables de cadena ligera y pesada (VL y VH) preparando los sitios de unión a antígeno de IgG completas CR011 y dirigidas contra CD3. El enlazante intermedio que une los 2 componentes de scFv individuales juntos (mostrados en línea de rayas) puede desempeñar una función clave en la determinación de la actividad resultante de cada uno de los componentes de scFv que incluye la actividad citolítica eficaz proporcionada por las células T citotóxicas ajustadas por el componente de scFv dirigido contra CD3 del bi-scFv.

Figura 18: **A.** Resultados de ELISA para scFv de CR011 (cuadrados) y bi-scFv de CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) (diamantes). Ambos anticuerpos CR011 manipulados genéticamente se unieron a la diana GPNMB. **B.** Transferencia Western de 2 de los productos de anticuerpos CR011 manipulados genéticamente (flechas). El clon 16 se correspondió con la línea CHOK1 que expresa scFv de CR011 (monómero), mientras que el clon 17 se correspondió con la línea CHOK1 que expresa bi-scFv de CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) (dímero). Los clones 16 y 17 se usan para producir los productos de anticuerpos manipulados genéticamente.

Figura 19: Análisis por citometría de flujo de la unión de los productos de scFv de CR011 y de bi-scFv de CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) a la proteína GPNMB nativa expresada sobre la superficie celular de células diana. Se usan células T humanas como fuente de CD3, mientras que se usan células SK-MEL-5 como fuente de GPNMB.

Figura 20: El análisis de citotoxicidad mostró que bi-scFv de CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) purificado, pero no scFv de CR011, produce la destrucción de células tumorales SK-MEL-5 positivas para GPNMB por linfocitos T.

Figura 21: Estructura química de maleimidocoaproil-valina-citrulina-monometil-auristatina E (vcMMAE).

Figura 22: Los disulfuros sobre el anticuerpo CR011 se reducen suavemente en presencia de TCEP para generar ~4 tioles por Ab. Entonces se añade vcMMAE a la disolución de anticuerpo. El ataque nucleófilo de los tiolatos sobre los grupos de maleimida produce un enlace de tioéster estable. El conjugado resultante se purifica a partir de la mezcla.

Figura 23: Reacción de vcMMAE con NAcCys a pH 7,0 y pH 9,0 en presencia o ausencia de TCEP. 1A: vcMMAE se convierte completamente en el aducto de NAcCys tras una incubación en tampón fosfato a pH 7. B-E: Aspecto de un producto secundario en un transcurso de la incubación de vcMMAE en tampón borato. F-I: Aspecto de productos secundarios en borato a pH 9 y en presencia de TCEP.

Figura 24: Identificación por EM-CL del producto secundario con tiempo de retención de 9,2 min que no puede reaccionar con cisteína y, por tanto, no puede conjugarse con CR011.

Figura 25: Cinética de formación de NAcCys-vcMMAE y del producto secundario (succinimidil-vcMMAE) tras la incubación en tampón borato a pH 9,0 en presencia o ausencia de TCEP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se usa en este documento, el término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina o un fragmento o un derivado de la misma y engloba cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno, independientemente de si se produce in vitro o in vivo. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, manipulados e injertados. A menos que se modifique de otro modo por el término “intacto”, como en “anticuerpos intactos” con los fines de esta divulgación, el término “anticuerpo” también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')2, Fv, scFv, bi-scFv, bi-Ab, Fd, dAb y otros fragmentos de anticuerpos que conservan la función de unión a antígeno, es decir, la capacidad de unirse a GPNMB específicamente. Normalmente, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno.

Como se usa en este documento, los términos “dominio de unión a antígeno”, “fragmento de unión a antígeno” y “fragmento de unión” se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. En casos en los que un antígeno es grande, el dominio de unión a antígeno sólo puede unirse a una parte del antígeno. Una parte de la molécula de antígeno que es responsable de interacciones específicas con el dominio de unión a antígeno se denomina en lo sucesivo “epítopo” o “determinante antigénico”.

Un dominio de unión a antígeno comprende normalmente una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (V_L) y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H); sin embargo, necesariamente no tiene que comprender ambas. Por ejemplo, un llamado fragmento Fd de anticuerpo sólo está constituido por un dominio V_H, pero todavía conserva algo de función de unión a antígeno del anticuerpo intacto.

Como se usa en este documento, el término “repertorio” se refiere a una colección genéticamente diversa de nucleótidos derivados completamente o parcialmente de secuencias que codifican inmunoglobulinas expresadas. Las secuencias se generan por transposición in vivo de, por ejemplo, segmentos V, D y J para cadenas H y, por ejemplo, el segmento V y J para cadenas L. Alternativamente, las secuencias pueden generarse a partir de una línea celular por estimulación in vitro en respuesta a lo cual se produce la transposición. Alternativamente, parte o todas las secuencias pueden obtenerse combinando, por ejemplo, segmentos V sin transponer con segmentos D y J mediante síntesis de nucleótidos, mutagénesis aleatorizada y otros procedimientos, por ejemplo, como se desvela en la patente de EE.UU. nº 5.565.332.

Como se usa en este documento, los términos “interacción específica” y “unión específica” se refieren a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada que se distingue de la unión no específica que normalmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K_A es superior a 10^6 M^{-1}, o más preferentemente superior a 10^8 M^{-1}. Si fuera necesario, la unión no específica puede reducirse sin afectar sustancialmente la unión específica variando las condiciones de unión. Las condiciones de unión apropiadas tales como concentración de anticuerpos, fuerza iónica de la disolución, temperatura, tiempo permitido para la unión, concentración de un agente de bloqueo (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de la leche), etc., pueden ser optimizadas por un experto usando técnicas rutinarias.

Como se usa en este documento, el término “como se expone sustancialmente” se refiere a que el dominio CDR, V_H o V_L pertinente de la invención será o idéntico a o sólo tendrá diferencias insustanciales en las regiones especificadas (por ejemplo, una CDR) cuya secuencia se expone. Las diferencias insustanciales incluyen cambios menores de aminoácidos tales como sustituciones de 1 ó 2 de 5 aminoácidos cualesquiera en la secuencia de una región especificada.

El término “CR011” se refiere a un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une específicamente a GPNMB, denominado en lo sucesivo mAb 1.15.1 como se describe en este documento, o derivados o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

El término “GPNMB” se refiere a la glicoproteína transmembrana posible como se ha descrito anteriormente, con esencialmente la secuencia que se depositó en el número de registro X76534 en la base de datos EMBL, y variantes menores de la misma.

El término “CG56972” se refiere al ADNc específico aislado como se describe en el Ejemplo 27 (página 113, líneas 13-29); su secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 289. Se corresponde con el dominio extracelular posible de una supuesta variante de corte y empalme de GPNMB. El producto de traducción de este ADNc se usó como antígeno para producir los anticuerpos de la invención.

Como se usa en este documento, el término “actividad de GPNMB” se refiere a una o más actividades asociadas a GPNMB. “Modular” la actividad de GPNMB es alterar los resultados iniciales observados con, y que pueden atribuirse a, GPNMB. “Neutralizar” GPNMB es cancelar uno o más efectos, por ejemplo, la actividad observada con, y que puede atribuirse a GPNMB.

Como se usa en este documento, el término “aislado” se refiere a una molécula que está sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente de células o tejidos de la que se deriva. El término “aislado” también se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para administrarse como una composición farmacéutica, o al menos el 70-80% (peso/peso) de pureza, más preferentemente al menos el 80-90% (peso/peso) de pureza, incluso más preferentemente el 90-95% de pureza; y lo más preferentemente al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% (peso/peso) de pureza.

Como se usa en este documento, el término “inhibir” o “inhibición de” se refiere a reducir en una cantidad medible, o prevenir completamente.

Como se usa en este documento, el término “efecto citotóxico” en referencia al efecto de un agente sobre una célula significa destruir la célula. El “efecto citostático” se refiere a una inhibición de la proliferación celular. Un “agente citotóxico” se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula, reduciéndose o

inhibiéndose así el crecimiento de, respectivamente, células dentro de una población de células.

Como se usa en este documento, los términos “previenen”, “prevenir” y “prevención” se refieren a la inhibición del desarrollo o aparición de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) o la prevención de la reaparición, aparición o desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) en un sujeto resultante de la administración de una terapia o la administración de una combinación de terapias.

Como se usa en este documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a una dosificación o cantidad que es suficiente para reducir la actividad de GPNMB para producir la mejora de síntomas en un paciente o para lograr un resultado biológico deseado.

Como se usa en este documento, el término “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para producir la prevención del desarrollo, reaparición o aparición de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) o uno o más síntomas del mismo, o para potenciar o mejorar el (los) efecto(s) profiláctico(s) de otra terapia.

Como se usa en este documento, un “protocolo” incluye programas de dosificación y pautas de dosificación. Los protocolos en este documento son procedimientos de uso e incluyen protocolos profilácticos y terapéuticos.

Como se usa en este documento, los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente. Como se usa en este documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, preferentemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono tal como un macaco, chimpancé y un ser humano), y más preferentemente un ser humano.

Como se usa en este documento, los términos “agente terapéutico” y “agentes terapéuticos” se refieren a un agente que puede usarse en la prevención, tratamiento, manejo o mejora de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) o uno o más síntomas del mismo. En ciertas realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a GPNMB. En ciertas otras realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un agente distinto de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a GPNMB.

Como se usa en este documento, los términos “terapias” y “terapia” pueden referirse a cualquier protocolo, procedimiento y/o agente que pueda usarse en la prevención, tratamiento, manejo o mejora de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) o uno o más síntomas del mismo. En ciertas realizaciones, los términos “terapias” y “terapia” se refieren a terapia anticancerosa, terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento, manejo, prevención o mejora de cáncer o uno o más síntomas del mismo conocidos por un experto en la materia tal como el personal médico.

Como se usa en este documento, los términos “tratan”, “tratamiento” y “tratar” se refieren a la erradicación, extirpación, modificación o control de tejido canceroso primario, regional o metastásico, o a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB, o mejora de uno o más síntomas del mismo resultante de la administración de una o más terapias. En ciertas realizaciones, tales términos en el contexto de cáncer se refieren a una reducción en el crecimiento de células cancerosas, una disminución en el número de células cancerosas y/o una reducción en el crecimiento, formación y/o volumen de un tumor. En otras realizaciones, tales términos se refieren a la minimización o retraso de la propagación del cáncer resultante de la administración de una o más terapias a un sujeto con una enfermedad tal. El tratamiento puede incluir, por ejemplo, una disminución en la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de recaída.

A menos que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos usados a propósito de la invención descrita en este documento deben tener los significados que son comúnmente entendidos por aquellos expertos en la materia. Además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular deben incluir pluralidades y los términos en plural deben incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas a propósito de, y técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular y química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridación descritas en este documento son aquellas muy conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas convencionales se usan para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y la técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como comúnmente se realizan en la técnica o como se describen en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según procedimientos convencionales muy conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se tratan en toda la presente memoria descriptiva (véase, por ejemplo, Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989). Las nomenclaturas utilizadas a propósito de, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en este documento son muy conocidas y comúnmente se usan en la técnica. Las técnicas convencionales se usan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas y tratamiento de pacientes.

La presente invención proporciona combinaciones de V, D, J de cadena pesada y combinaciones V, J de cadena ligera de anticuerpos humanos de la línea germinal que incluyen la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos

de las regiones FR y CDR de los dominios V_H y V_L con especificidad por GPNMB.

Tras la exposición al antígeno, aquellas células B con especificidad de unión a antígeno basadas en secuencias de la línea germinal se activan, proliferan y se diferencian para producir inmunoglobulinas de diferentes isotipos, además de experimentar mutación somática y/o maduración por afinidad para producir inmunoglobulinas de mayor afinidad por el antígeno. La presente invención proporciona la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de tales regiones FR y CDR del dominio V maduradas por afinidad que tienen especificidad por GPNMB.

Los fragmentos de anticuerpos del tipo Fab que contienen la porción de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo pueden estar constituidos por la cadena L unida covalentemente por un enlace disulfuro a una porción de la cadena H que tiene el dominio V y el primer dominio constante. El fragmento de anticuerpo Fv monocatenario (scFv) tiene el dominio variable H unido al dominio variable L por un enlazante de polipéptidos. La invención proporciona fragmentos de anticuerpos tales como moléculas de Fab y scFv que tienen secuencias derivadas de dominios V de la línea germinal o madurados por afinidad de anticuerpos que se unen específicamente a GPNMB.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab' (véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, 1990 Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny y col., 1992 J. Immunol. 148:1547-1553). Los anticuerpos biespecíficos no existen en forma de fragmentos que tienen un único sitio de unión (por ejemplo, Fab, Fab' y Fv).

Se apreciará que tales anticuerpos bifuncionales o biespecíficos están contemplados y englobados por la invención. Un anticuerpo monocatenario biespecífico con especificidad por GPNMB y por el antígeno CD3 en linfocitos T citotóxicos puede usarse para dirigir estas células T hacia células tumorales que expresan GPNMB y producir apoptosis y erradicación del tumor. Las construcciones de scFv biespecíficos para este fin se describen en este documento. Los componentes de scFv específicos para GPNMB pueden derivarse de anticuerpos dirigidos contra GPNMB descritos en este documento. En algunas realizaciones, los componentes del anticuerpo dirigido contra GPNMB desvelados en este documento pueden usarse para generar un scFv biológicamente activo dirigido contra GPNMB. El componente de scFv dirigido contra CD3 del scFv biespecífico terapéutico se derivó de una secuencia depositada en Genbank (número de registro CAE85148). Anticuerpos alternativos conocidos por elegir como diana CD3 u otros antígenos de células T pueden ser similarmente eficaces en el tratamiento de tumores malignos cuando se acoplan con anticuerpos dirigidos contra GPNMB, tanto en un esqueleto monocatenario como una IgG completa.

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden incluir dominios constantes H o L que incluyen regiones constantes kappa o lambda L, o cualquier dominio constante de isotipo H. Un anticuerpo humano con especificidad de unión por GPNMB puede contener secuencias de la línea germinal tales como las regiones V de cadena pesada: VH1-2 (SEQ ID NO: 308), VH2-5 (SEQ ID NO: 360), VH3-11 (SEQ ID NO: 361), VH3-21 (SEQ ID NO: 362), VH3-30 (SEQ ID NO:363), VH3-33 (SEQ ID NO: 364), VH4-31 (SEQ ID NO: 365), VH4-59 (SEQ ID NO:366) o VH5-51 (SEQ ID NO:367); la región D de cadena pesada: D1-20 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO: 375), D1-26 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO:376), D3-10 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO:377), D3-16 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO:378), D3-22 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO: 379), D3-9 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO:380), D4-17 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO: 381), D5-24 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO: 382), D6-13 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO:383) o D6-19 (secuencias de aminoácidos traducidas por SEQ ID NO: 384); la región J de cadena pesada: JH3b (SEQ ID NO: 385), JH4b (SEQ ID NO:386), JH5b (SEQ ID NO: 387) o JH6b (SEQ ID NO: 388); las regiones V de cadena ligera kappa A2 (SEQ ID NO:373), A3 (SEQ ID NO: 371), A20 (SEQ ID NO: 370), A27 (SEQ ID NO: 369), A30 (SEQ ID NO:374), L2 (SEQ ID NO:372) o O1 (SEQ ID NO: 368); y la región J JK1 (SEQ ID NO:389), JK2 (SEQ ID NO: 390), JK3 (SEQ ID NO: 391), JK4 (SEQ ID NO: 392) o JK5 (SEQ ID NO: 393). (Generalmente, véase Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1987 y 1991; véase también Chothia & Lesk 1987 J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia y col. 1989 Nature 342:878-883). Los anticuerpos humanos con especificidad de unión por GPNMB pueden combinarse con regiones de la línea germinal como se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1: Combinaciones de regiones de la línea germinal de anticuerpos dirigidos contra GPNMB humanos.

Ab	VH	D	JH	VL	JL
1.10.2	VH4-59	D6-19	JH4b	A3	JK5
1.15.1	VH4-31	D-20	JH4b	L2	JK1
1.2.2	VH2-5	D3-16	JH4b	O1	JK5
1.7.1	VH4-31	D1-20	JH4b	L2	JK1
2.10.2	VH3-30	D3-10	JH6b	A3	JK5
2.15.1	VH3-33	D4-17	JH4b	A20	JK4
2.16.1	VH3-11	D6-13	JH3b	L2	JK3
2.17.1	VH1-2	D6-19	JH5b	A2	JK4
2.21.2	VH3-21	D1-26	JH4b	A20	JK5
2.22.1	VH4-31	D3-22	JH6b	A30	JK1
2.24.1	VH5-51	D5-24	JH4b	A27	JK1
2.3.1	VH1-2	D3-10	JH4b	A2	JK4
2.7.1	VH3-33	D3-10	JH4b	A20	JK4
2.8.1	VH2-5	D3-9	JH4b	O1	JK4

El anticuerpo aislado puede tener un polipéptido de región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por SEQ ID NO:2, 20, 38, 56, 74, 92, 110, 128, 146, 164, 182, 200, 218, 236, 253, 256, 260, 265, 270, 274, 277, 281 y 285. Tales secuencias de aminoácidos pueden ser codificadas por las secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que está constituido por SEQ ID NO: 1, 19, 37, 55, 73, 91, 109, 127, 145, 163, 181, 199, 217 y 235. También se desvela un anticuerpo aislado que se une específicamente a GPNMB y tiene un polipéptido de región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por SEQ ID NO: 11, 29, 47, 65, 83, 101, 119, 137, 155, 173, 191, 209, 227 y 245. Tales secuencias de aminoácidos pueden ser codificadas por las secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que está constituido por SEQ ID NO: 10, 28, 46, 64, 82, 100, 118, 136, 154, 172, 190, 208, 226 y 244. También se desvela un anticuerpo aislado que se une específicamente a GPNMB y tiene un polipéptido de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por SEQ ID NO: 2, 20, 38, 56, 74, 92, 110, 128, 146, 164, 182, 200, 218, 236, 253, 256, 260, 265, 270, 274, 277, 281 y 285 y tiene un polipéptido de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está constituido por SEQ ID NO: 11, 29, 47, 65, 83, 101, 119, 137, 155, 173, 191, 209, 227 y 245. Los anticuerpos dirigidos contra GPNMB pueden comprender al menos una CDR de cualquiera de las secuencias de polipéptidos de CDR H o L SEQ ID NO: 4, 6, 8, 13, 15, 17, 22, 24, 26, 31, 33, 35, 40, 42, 44, 49, 51, 53, 58, 60, 62, 67, 69, 71, 76, 78, 80, 85, 87, 89, 94, 96, 98, 103, 105, 107, 112, 114, 116, 121, 123, 125, 130, 132, 134, 139, 141, 143, 148, 150, 152, 157, 159, 161, 166, 168, 170, 175, 177, 179, 184, 186, 188, 193, 195, 197, 202, 204, 206, 211, 213, 215, 220, 222, 224, 229, 231, 233, 238, 240, 242, 247, 249, 251, 254, 257, 261, 266, 271, 278, 282, 286, 255, 258, 262, 267, 272, 275, 279, 283, 287, 259, 263, 264, 268, 269, 273, 276, 280, 284 y 288.

En una realización particular, el anticuerpo dirigido contra GPNMB humano es Mab1.15.1. Este anticuerpo y otros anticuerpos dirigidos contra GPNMB descritos en este documento tienen secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos que los codifican identificadas en esta solicitud como se muestra en las Tablas 2A-2D.

TABLA 2A Secuencias de nucleótidos (ADN) y de aminoácidos (AA) de anticuerpos

Segmento génico	1.10.2	1.15.1	1.2.2	1.7.1
ADN variable H	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:55
AA variable H	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:56
H FR1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:57
H CDR1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:58
H FR2	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:59
H CDR2	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:60
H FR3	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:61
H CDR3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:62
H FR4	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:63
ADN variable L	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:64
AA variable L	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:65
L FR1	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:66
L CDR1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:67
L FR2	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:68
L CDR2	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:69
L FR3	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:70
L CDR3	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:71
L FR4	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:72

TABLA 2B: Secuencias de nucleótidos (ADN) y de aminoácidos (AA) de anticuerpos

Segmento génico	2.10.2	2.15.1	2.16.1	2.17.1
ADN variable H	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:109	SEQ ID NO:127
AA variable H	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:128
H FR1	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:111	SEQ ID NO:129
H CDR1	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:112	SEQ ID NO:130
H FR2	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:131
H CDR2	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:114	SEQ ID NO:132
H FR3	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:133
H CDR3	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:116	SEQ ID NO:134
H FR4	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:99	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:135
ADN variable L	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:136
AA variable L	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:137
L FR1	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:102	SEQ ID NO:120	SEQ ID NO:138
L CDR1	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:139
L FR2	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:104	SEQ ID NO:122	SEQ ID NO:140
L CDR2	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:123	SEQ ID NO:141
L FR3	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:124	SEQ ID NO:142
L CDR3	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:125	SEQ ID NO:143
L FR4	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:108	SEQ ID NO:126	SEQ ID NO:144

TABLA 2C: Secuencias de nucleótidos (ADN) y de aminoácidos (AA) de anticuerpos

Segmento génico	2.21.2	2.22.1	2.24.1	2.3.1
ADN variable H	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:163	SEQ ID NO:181	SEQ ID NO:199
AA variable H	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:182	SEQ ID NO:200
H FR1	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:165	SEQ ID NO:183	SEQ ID NO:201
H CDR1	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:166	SEQ ID NO:184	SEQ ID NO:202
H FR2	SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:167	SEQ ID NO:185	SEQ ID NO:203
H CDR2	SEQ ID NO:150	SEQ ID NO:168	SEQ ID NO:186	SEQ ID NO:204
H FR3	SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:169	SEQ ID NO:187	SEQ ID NO:205
H CDR3	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:170	SEQ ID NO:188	SEQ ID NO:206
H FR4	SEQ ID NO:153	SEQ ID NO:171	SEQ ID NO:189	SEQ ID NO:207
ADN variable L	SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:172	SEQ ID NO:190	SEQ ID NO:208
AA variable L	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:173	SEQ ID NO:191	SEQ ID NO:209
L FR1	SEQ ID NO:156	SEQ ID NO:174	SEQ ID NO:192	SEQ ID NO:210
L CDR1	SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:193	SEQ ID NO:211
L FR2	SEQ ID NO:158	SEQ ID NO:176	SEQ ID NO:194	SEQ ID NO:212
L CDR2	SEQ ID NO:159	SEQ ID NO:177	SEQ ID NO:195	SEQ ID NO:213
L FR3	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:178	SEQ ID NO:196	SEQ ID NO:214
L CDR3	SEQ ID NO:161	SEQ ID NO:179	SEQ ID NO:197	SEQ ID NO:215
L FR4	SEQ ID NO:162	SEQ ID NO:180	SEQ ID NO:198	SEQ ID NO:216

TABLA 2D: Secuencias de nucleótidos (ADN) y de aminoácidos (AA) de anticuerpos

Segmento génico	2.7.1	2.8.1
ADN variable H	SEQ ID NO:217	SEQ ID NO:235
AA variable H	SEQ ID NO:218	SEQ ID NO:236
H FR1	SEQ ID NO:219	SEQ ID NO:237
H CDR1	SEQ ID NO:220	SEQ ID NO:238
H FR2	SEQ ID N0:221	SEQ ID NO:239
H CDR2	SEQ ID NO:222	SEQ ID NO:240
H FR3	SEQ ID NO:223	SEQ ID NO:241
H CDR3	SEQ ID NO:224	SEQ ID NO:242
H FR4	SEQ ID NO:225	SEQ ID NO:243
ADN variable L	SEQ ID NO:226	SEQ ID NO:244
AA variable L	SEQ ID NO:227	SEQ ID NO:245
L FR1	SEQ ID NO:228	SEQ ID NO:246
L CDR1	SEQ ID NO:229	SEQ ID NO:247
L FR2	SEQ ID NO:230	SEQ ID NO:248
L CDR2	SEQ ID NO:231	SEQ ID NO:249
L FR3	SEQ ID NO:232	SEQ ID NO:250
L CDR3	SEQ ID NO:233	SEQ ID NO:251
L FR4	SEQ ID NO:234	SEQ ID NO:252

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH4-31:

En una realización particular, los anticuerpos humanos de unión a GPNMB de la invención comprenden la región de cadena pesada V de la línea germinal VH4-31 o se derivan de la misma y tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

X_1SGPGLVKPSQX_2LSLTCTVSGGSISSX_3X_4YX_5WX_6WJRX_7HPGKGLEWIGYIYYSGX_8TYX_9NPSLKS RVX_{10}ISVDTSKNQFSLX_{11}LSSVTAADTAVYYCAR

En la que: X1 es E o Q;

X2 es T o N;

X3 es A, F o G;

X4 es N o G;

X5 es Y o F;

X6 es T o S;

X7 es Q o H;

X8 es S o N;

X9 es C, S o Y;

X10 es I o T;

X11 es K o T;

(SEQ ID NO:253).

La SEQ ID NO:253 puede combinarse con D3-22 o D1-20. Además la combinación de SEQ ID NO:253 con D3-22 o D1-20 se combina con JH6b o JH4b y en realizaciones específicas, después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo Mab1.15.1, Mab1.7.1 y Mab2.22.1, tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:20, 56 y 164 y pueden ser codificados por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO:19, 55 y 163.

Además, en realizaciones particulares, las secuencias de CDR1 de cadena H son la CDR de VH4-31 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR1: GGSIS $SX_3X_4YX_5WX_6$

En la que: X3 es A, F o G;

X4 es N o G;

X5 es Y o F;

X6 es T o S;

(SEQ ID NO:254).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 seleccionada de las siguientes: SEQ ID NO:22, 58, 166.

En realizaciones particulares, las secuencias de CDR2 de la cadena H son la CDR de VH4-31 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: $YIYYSGX_8TYX_9NPSLKS$

En la que: X8 es S o N;

X9 es C, S o Y;

(SEQ ID NO:255).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 seleccionada de las siguientes: SEQ ID NO: 24, 60 y 168.

La secuencia de CDR3 de la cadena H puede ser una combinación de D3-22, JH6b que tiene SEQ ID NO:170. Alternativamente, la secuencia de CDR3 de la cadena H puede ser una combinación de D1-20, JH4b que tiene SEQ ID NO:26 ó 62.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH1-2:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH-2 o se derivan de la misma e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA GYTFT GX_1YMH WVRQX_2PGQGLEWMG W1NPNSGGTX_3-YX_4QKFQX_5 RVTMTRD TSISTX_6YMELSRLRSDDTAVYYCAR

En la que: X1 es Y o F;

X2 es A o T;

X3 es N o Y;

X4 es A o V;

X5 es D o G;

X6 es A o V;

(SEQ ID NO: 256).

La SEQ ID NO:256 puede combinarse con D3-10 o D6-19.

Además, la combinación de SEQ ID NO:256 con D3-10 o D6-19 se combina con JH4b o JH5b y después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 2.3.1 y mAb 2.17.1, tienen secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:128 y 200 y pueden ser codificados por las secuencias de nucleótidos de SEQ

ID NO:127 y 199.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR de VH1-2 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR1: GYTPTGX_1YMH

En la que: X1 es Y o F,

(SEQ ID NO:257).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 seleccionada de SEQ ID NO: 130 y 202.

En las secuencias de CDR2 de cadena H puede ser la CDR de VH1-2 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: WiNPNSGGTX_3YX_4QKFQX_5

En la que: X3 es N o Y;

X4 es A o V;

X5 es D o G

(SEQ ID NO:258).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 seleccionada de SEQ ID NO:132 y 204.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H son combinaciones de D3-10, JH4b de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de las mismas que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: $X_1X_2X_3$GSGSX_4X_5

En la que: X1 es Y o D;

X2 es Y o F;

X3 es Y o F;

X4 es Y o L;

X5 es Y o L

(SEQ ID NO:259).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR3 seleccionada de SEQ ID NO:134 y 206.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH2-5:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH2-5 o se derivan de la misma e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

ITLKESGPTLVX_1PTQTLTLTCTFS GFSLSX_1X_3GX_4GVG WIRQPPOKALX_5WLX_6LIYWNDDKX_7Y-SPSLX_8SRLTITK DTSKNQVVLX_9X_{10}TNMDPVDTATYYCAH

En la que: X1 es K o T;

X2 es T o A;

X3 es S o G;

X4 es M o V;

X5 es D o E;

X6 es A o T;

X7 es R o H;

X8 es K o R;

X9 es T o R;

X10 es M o 1;

(SEQ ID NO:260).

La SEQ ID NO:260 puede combinarse con D3-9 o D3-16 y además puede combinarse con JH4b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo, mAb 2.8.1 y mAb 1.2.2, tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 38 y 236 y pueden ser codificados por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 37 y 235.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR de VH2-5 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR1: GFSLS $X_2X_3GX_4GVG$

En la que: X2 es T o A;

X3 es S o G;

X4 es M o V;

(SEQ ID NO:261).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 seleccionada de SEQ ID NO: 40 y 238.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH2-5 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: $LIYWNODKX_7YSPSLX_8S$

En la que: X7 es R o H;

X8 es K o R;

(SEQ ID NO:262).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 seleccionada de SEQ ID NO:42 y 240.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D3-9, JH4b de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: $X_1YDILTGX_2X_3$

En la que: X1 es Y o H;

X2 es Y o F; y

X3 es Y o N

(SEQ ID NO:263).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB comprende una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:242.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D3-16, JH4b de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: YDYX1WGS

En la que: X1 es V o D

(SEQ ID NO:264).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB comprende una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO: 44.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH3-33:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH3-33 o se derivan de la misma y tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

$QVQLX_1X_2SGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFX_3X_4YGX_5H$ WVRQAPGKGLEWVA $YIWX_6DGX_7N$-KYY ADSYKG RFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDXBAVYYCAX,

En la que: X1 es V o E;

X2 es E o Q;

X3 es S o N;

X4 es S o N;

X5 es M o 1;

X6 es Y o F;

X7 es S o R;

X8 es T o A;

X9 es R o K

(SEQ ID NO:265).

La SEQ ID NO:265 puede combinarse con D3-10 o D4-17 y además con JH4b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 2.7.1 y mAb 2.15.1, tienen secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:92 y 218 y pueden ser codificados por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO:91 y 217.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR de VH3-33 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR1: $GFTFX_3X_4YGX_5H$

En la que: X3 es S o N;

X4 es S o N;

X5 es M o I;

(SEQ ID NO:266).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:94 y 220.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH3-33 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: $VIWX_6DOX_7NKYYADSVKG$

En la que: X6 es Y o F;

X7 es S o R;

(SEQ ID NO:267).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 seleccionada de SEQ ID NO:96 y 222.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D3-10, JH4b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: $YYYGSGX_1$

En la que: X1 es S o L

(SEQ ID NO:268).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 2.7.1 desvelado en este documento tiene una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:224.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D4-17, JH4b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: $DYGDX_1$

En la que: X es Y o S

(SEQ ID NO:269).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 2.15.1 desvelado en este documento tiene una secuencia de CDR3 de

aminoácidos SEQ ID NO: 98.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH3-11:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH3-11 o se derivan de la misma y tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS $X_1YX_2MX_3$ WIRQAPGKGLEWVS $YISX_4SGSX_5X_6$-X_7YADSVKG RFTX_8SRADNKNSLILQMNSLRAEDTAVYYCAR

En la que: X1 es D o S;

X2 es S o Y;

X3 es S o T;

X4 es S o I;

X5 es T o I;

X6 es T o I;

X7 es Y o H;

X8 es I o M;

(SEQ ID NO:270).

La SEQ ID NO:270 puede combinarse con D6-13 y además con JH3b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 2.16.1, tienen una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:110 y pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:109.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR1 de VH3-11 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR1: GFTFS $X_1YX_2MX_3$

En la que: X1 es D o S;

X2 es S o Y;

X3 es S o T;

(SEQ ID NO:271).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 de aminoácidos SEQ ID NO:112.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH3-11 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: $YISX_4SGSX_5X_6X_7$YADSVIKG

En la que: X4 es S o I;

X5 es T o I;

X6 es T o I;

X7 es Y o H;

(SEQ ID NO:272).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 SEQ ID NO:114.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D6-13, JH3b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: X_1X_2AAAG- - AFDI

En la que: X1 es G o D;

X2 es I o G;

(SEQ ID NO:273).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 2.16.1 desvelado en este documento tiene una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:116.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH3-21:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH3-21 o se derivan de la misma y tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

X_1VQLX_2X_3SGGGLVKPGGSLRX_4 SCAAS GFTFS SYSMN WVRQAPGKGLEWVS X_5ISS SSSYI-YYADSVKG RFTISRADNKNSLILQMNSLRAEDTAVYYCAR

En la que: X1 es E o Q;

X2 es V o E;

X3 es E o Q;

X4 es F o L;

X5 es S o F;

(SEQ ID NO:274).

La SEQ ID NO:274 puede combinarse con D1-26 y además con JH4b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 2.21.1, pueden tener una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:146 y pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:145.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR1 de VH3-21 de la línea germinal, SEQ ID NO:148 o secuencias maduradas por afinidad de las mismas.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH3-21 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: X_5ISS SSSYIYYADSVKG

En la que: X5 es S o F;

(SEQ ID NO:275).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 de aminoácidos SEQ ID NO:150.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D1-26, JH4b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: X_1X_2VGAT-FDY

En la que: X1 es G o D;

X2 es 1 o W;

(SEQ ID NO:276).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 2.21.1 desvelado en este documento tiene una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:152.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH3-30:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH3-30 o se derivan de la misma e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFX$_1$FS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISYDGX$_2$NKYYAD-SVKG RFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDTAVYYCAK

En la que: X1 es T o A;

X2 es S o N;

(SEQ ID NO:277).

La SEQ ID NO:277 puede combinarse con D3-10 y además con JH6b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 2.10.2, pueden tener una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:74 y pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:73.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR1 de VH3-30 de la línea germinal o

secuencias maduradas por afinidad de la misma que tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

$GFX_1FS\ SYGMH$

En la que: X1 es T o A;

(SEQ ID NO:278).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 SEQ ID NO:76.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH3-30 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: $VISYDGX_2NKYYADSVKG$

En la que: X2 es S o N;

(SEQ ID NO:279).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 de aminoácidos SEQ ID NO:78.

La secuencia de CDR3 de la cadena H puede ser combinaciones de D3-10, JH6b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: $X_1X_2X_3VRGX_4X_5X_6$

En la que: X1 es I o D;

X2 es T o L;

X3 es M o V;

X4 es V o I;

X5 es I o R;

X6 es I o G;

(SEQ ID NO:280).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 2.10.2 desvelado en este documento tiene una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:80.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH4-59:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH4-59 o se derivan de la misma e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

$QVQLQESOPGLVKPSETLSLTCTVS\ GX_1SIS\ X_2YYWSWIRQPPGKGLEWIG\ YX_3YYSGSTNYN$-PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

En la que: X1 es G o D;

X2 es S o N;

X3 es I o F;

(SEQ I D NO:281).

La SEQ ID NO:281 puede combinarse con D6-19 y además con JH4b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 1.10.24, pueden tener una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR1 de VH4-59 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma que tienen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

GX1SIS X2YYWS

En la que: X1 es G o D;

X2 es S o N;

(SEQ ID NO:282).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 SEQ ID NO:4.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH4-59 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: YX3YYSGSTNYNPSLKS

En la que: X3 es I o F;

(SEQ ID NO:283).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 de aminoácidos SEQ ID NO:6.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D6-19, JH4b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: X1X2 GW---DY

En la que: X1 es S o D;

X2 es S o R;

(SEQ ID NO:284).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 1.10.2 descrito en este documento tiene una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:8.

Anticuerpos dirigidos contra GPNMB derivados de VH5-51:

Los anticuerpos humanos de unión a GPNMB pueden comprender una región de cadena pesada V de la línea germinal VH-51 o se derivan de la misma e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

QLVQSGAEVKKPGESLKISCX$_1$GS GYX$_2$FTX$_3$YWIG WVRQMPGKGLEWMG X$_4$IYPX$_5$DSDTRYS-PSFQG QVTISADKSISTAILQWSSLKASDTAX$_6$YYCAR

En la que: X1 es K o Q;

X2 es S o I;

X3 es S o N;

X4 es I o V;

X5 es G o D;

X6 es M o I;

(SEQ ID NO:285).

La SEQ ID NO:285 puede combinarse con D5-24 y además con JH4b. Después de la maduración por afinidad, estos anticuerpos humanos de unión a GPNMB, por ejemplo mAb 2.24.1, pueden tener una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:182 y pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:181.

Además, las secuencias de CDR1 de la cadena H pueden ser la CDR1 de VH-51 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos de fórmula:

GYX$_2$FT X$_3$YWIG

En la que: X2 es S o 1;

X3 es S o N;

(SEQ ID NO:286).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR1 SEQ ID NO:184.

Las secuencias de CDR2 de la cadena H pueden ser la CDR2 de VH5-51 de la línea germinal o secuencias maduradas por afinidad de la misma de fórmula:

CDR2: X$_4$IYPX$_5$DSDTRYSPSFQG

En la que: X4 es I o V;

X5 es G o D;

(SEQ ID NO:287).

Un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede comprender una secuencia de CDR2 de aminoácidos SEQ ID NO:186.

Las secuencias de CDR3 de la cadena H pueden ser combinaciones de D5-24, JH4b o secuencias maduradas por afinidad de las mismas e incluyen una secuencia de aminoácidos de fórmula:

CDR3: X_1WLQX_2--FDY

En la que: X1 es R o K;

X2 es L o H;

(SEQ ID NO:288).

El anticuerpo dirigido contra GPNMB 2.24.1 desvelado en este documento tiene una secuencia de CDR3 de aminoácidos SEQ ID NO:188.

Los anticuerpos de la invención se unen a un epítopo de CG56972 (SEQ ID NO:289), preferentemente dentro de la secuencia madura de GPNMB y más preferentemente dentro del dominio extracelular (ECD) de GPNMB.

Los anticuerpos de la invención se unen a GPNMB con una afinidad de 10^{-6} a 10^{-11}, preferentemente con una afinidad de 10^{-7} o superior e incluso más preferentemente 10^{-8} o superior. En una realización preferida, los anticuerpos descritos en este documento se unen a GPNMB con afinidades muy altas (Kd), por ejemplo, un anticuerpo humano que puede unirse a GPNMB con una Kd inferior a, pero no se limita a, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} o 10^{-14} M, o cualquier intervalo o valor dentro del mismo. Las mediciones de la afinidad y/o la avidez pueden medirse por KinExA® y/o BIACORE® como se describen en este documento. En realizaciones particulares, los anticuerpos de la invención se unen a GPNMB con Kd que oscilan de 50 a 150 pM.

La cartografía de epítopos y los análisis de estructuras secundarias y terciarias pueden llevarse a cabo para identificar estructuras 3D específicas asumidas por los anticuerpos desvelados y sus complejos con antígenos (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, ed. Morris, Humana Press, 1996). Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, cristalografía por rayos X (Biochem. Exp. Biol., 11:7-13, 1974) y modelado por ordenador de representaciones virtuales de los anticuerpos actualmente desvelados (Fletterick y col. (1986) Computer Graphics and Molecular Modeling, en Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Además, la parte específica del inmunógeno de proteína reconocido por el anticuerpo puede determinarse ensayando la reactividad del anticuerpo con respecto a partes de la proteína, por ejemplo, una mitad del extremo N y del extremo C. El fragmento reactivo resultante puede entonces diseccionarse adicionalmente, ensayándose consecutivamente partes más pequeñas del inmunógeno con el anticuerpo hasta que se defina el péptido reactivo mínimo. Alternativamente, la especificidad de unión, es decir, el epítopo, de anticuerpos dirigidos contra GPNMB de la invención puede determinarse sometiendo el inmunógeno de GPNMB a SDS-PAGE tanto en ausencia como en presencia de un agente reductor y analizarse por inmunotransferencia. La cartografía de epítopos también puede realizarse usando SELDI. Las matrices SELDI ProteinChip® (LumiCyte) se usaron para definir sitios de interacción proteína-proteína. El antígeno de la proteína GPNMB o fragmentos del mismo puede capturarse específicamente por anticuerpos covalentemente inmovilizados sobre la superficie de la matriz de ProteinCHIP. Los antígenos unidos pueden detectarse por un procedimiento de desorción inducido por láser y analizarse directamente para determinar su masa.

El epítopo reconocido por los anticuerpos dirigidos contra GPNMB descritos en este documento puede determinarse exponiendo la matriz ProteinCHIP a una biblioteca combinatoria de péptidos 12-meros al azar expresada en fago filamentoso (New England Biolabs). El fago unido al anticuerpo se eluye y luego se amplifica y se pasa por ciclos de unión y amplificación adicionales para enriquecer el conjunto en favor de las secuencias de unión. Después de tres o cuatro rondas, los clones de unión individuales se prueban adicionalmente para la unión mediante ensayos de ELISA en fago realizados sobre pocillos recubiertos con anticuerpo y se caracterizan por secuenciación de ADN específico de clones positivos.

Derivados

Esta divulgación también proporciona un procedimiento para obtener un anticuerpo específico para GPNMB. Las CDR en tales anticuerpos no se limitan a las secuencias específicas de los dominios variables H y L identificadas en la Tabla 1 y pueden incluir variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unirse específicamente a GPNMB. Un experto puede derivarse tales variantes de las secuencias enumeradas en la Tabla 1 usando técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en las FR y/o en las CDR. Mientras que los cambios en las FR se diseñan normalmente para mejorar la estabilidad e inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR se diseñan normalmente para aumentar la afinidad del anticuerpo por su diana. Las variantes de FR también incluyen alotipos de inmunoglobulina que se producen naturalmente. Tales cambios que aumentan la afinidad pueden determinarse empíricamente mediante técnicas rutinarias que implican alterar la CDR y probar la afinidad del anticuerpo por su diana. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de una cualquiera de las CDR desveladas. Pueden hacerse diversas alteraciones según los procedimientos descritos en la técnica (Antibody Engineering, 2ª ed., Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995). Éstas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos que están alteradas por la

sustitución de diferentes codones que codifican un residuo de aminoácido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciéndose así un cambio "silencioso". Por ejemplo, los aminoácidos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos (básicos) cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos (ácidos) cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido (véase la Tabla 3). Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede estar sustituido con alanina (Acta Physiol. Scant. Suppl. 643:55-67, 1998; Adv. Biophys. 35:1-24, 1998).

TABLA 3. Sustituciones de aminoácidos

Residuo de aa original	Posibles sustituciones	Sustitución preferida
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala Gly	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

Los derivados y análogos de anticuerpos de la invención pueden producirse por diversas técnicas muy conocidas en la técnica que incluyen procedimientos recombinantes y sintéticos (Maniatis (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., y Bodansky y col. (1995) The Practice of Peptide Synthesis. 2ª ed., Spring Verlag, Berlín, Alemania).

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión formando complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia de péptidos que se produce naturalmente. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones individuales o múltiples de aminoácidos (preferentemente sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia que se produce naturalmente (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forman contactos intermoleculares). Una sustitución conservativa de aminoácidos no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original,

o perturbar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica se describen en la técnica (por ejemplo, Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, NuevaYork (1984)).

Un procedimiento de preparación de un dominio variable H que es una secuencia de aminoácidos variante de un dominio variable H de la invención comprende una etapa de añadir, delecionar, sustituir o insertar uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio variable H actualmente desvelado, combinando opcionalmente el dominio variable H así provisto con uno o más dominios variables L, y probando el dominio variable H o combinación de variable H/variable L o combinaciones para uniones específicas a GPNMB o y, opcionalmente, probando la capacidad de tal dominio de unión a antígeno para modular la actividad de GPNMB. El dominio variable L puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica o es sustancialmente como se expone según la Tabla 1.

Puede emplearse un procedimiento análogo en el que una o más secuencias variantes de un dominio variable L desvelado en este documento se combinan con uno o más dominios variables H.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de fragmento de unión a antígeno que se une específicamente con GPNMB. El procedimiento comprende: (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifica un dominio variable H que incluye o bien una CDR3 que va a ser sustituida o bien carece de una región codificante de CDR3; (b) combinar el repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone sustancialmente en este documento para una CDR3 variable H de forma que el ácido nucleico donante se inserte en la región CDR3 en el repertorio de manera que se proporcione un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifica un dominio variable H; (c) expresar los ácidos nucleicos del repertorio de productos; (d) seleccionar un fragmento de unión específica para GPNMB; y (e) recuperar el fragmento de unión específica o ácido nucleico que lo codifica.

De nuevo puede emplearse un procedimiento análogo en el que una CDR3 variable L de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifica un dominio variable L, que incluye o bien una CDR3 que va a ser sustituida o bien carece de una región codificante de CDR3. El ácido nucleico donante puede seleccionarse de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos como se expone sustancialmente en SEQ ID NO: 2, 20, 38, 56, 74, 92, 110, 128, 146, 164, 182, 200, 218, 236, 253, 256, 260, 265, 270, 274, 277, 281, 285, 11, 29, 47, 65, 83, 101, 119, 137, 155, 173, 191, 209, 227 y 245. Una secuencia que codifica una CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de la CDR respectiva (por ejemplo, CDR3) usando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, usando la metodología descrita por Marks y col. (Bio/Technology (1992) 10: 779-783). En particular, los cebadores consenso dirigidos hacia o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable pueden usarse conjuntamente con cebadores consenso para la tercera región estructural de genes variables H humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables H que carecen de una CDR3. El repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 pueden barajarse con repertorios de dominios variables H o variables L que carecen de una CDR3, y los dominios variables H o variables L completos barajados combinarse con un dominio variable L o variable H relacionado para preparar los anticuerpos específicos de GPNMB. El repertorio puede entonces expresarse en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de expresión en fago tal como se describe en el documento WO92/01047 de manera que puedan seleccionarse fragmentos de unión a antígeno adecuados.

Pueden usarse técnicas de barajado o combinatorias análogas (por ejemplo, Stemmer, Nature (1994) 370: 389-391). Pueden generarse regiones variables H o variables L novedosas que llevan una o más secuencias derivadas de las secuencias desveladas en este documento usando mutagénesis al azar de uno o más genes variables H y/o variables L seleccionados tales como PCR propensa a error (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89: 3576-3580). Otro procedimiento que puede usarse es dirigir la mutagénesis a CDR de genes variables H o variables L (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1994) 91: 3809-3813; J. Mol. Biol. (1996) 263: 551-567). Similarmente, una o más, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios variables H o variables L, que luego se criban para un fragmento de unión a antígeno específico por GPNMB.

Una parte de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos una de las CDR como se expone sustancialmente en este documento y, opcionalmente, regiones estructurales intervinientes como se exponen en este documento. La porción puede incluir al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de FR1 y FR4, siendo el 50% el 50% del extremo C de FR1 y el 50% del extremo N de FR4. Residuos adicionales en el extremo N o extremo C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos no normalmente asociados a regiones de dominio variable que se producen naturalmente. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos por técnicas de ADN recombinante puede producir la introducción de residuos del extremo N o C codificados por enlazantes introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazantes para unir dominios variables a otras secuencias de proteínas que incluyen regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos), o marcas proteináceas como se tratan más adelante en mayor detalle.

Aunque los anticuerpos ilustrados en los ejemplos comprenden un par de “apareamiento” de dominios variables H y variables L, un experto reconocerá que los anticuerpos alternativos pueden comprender fragmentos de unión a antígeno que sólo contienen una única CDR de o bien el dominio variable L o bien el variable H. Uno cualquiera de los dominios de unión específicos monocatenarios puede usarse para cribar dominios complementarios que pueden

formar un fragmento de unión a antígeno específico de dos dominios que puede, por ejemplo, unirse a GPNMB. El cribado puede llevarse a cabo mediante procedimientos de cribado por expresión en fago usando la llamada solución combinatoria dual jerárquica desvelada en el documento WO92/01047 en la que una colonia individual que contiene o bien un clon de cadena H o bien L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifica la otra cadena (L o H), y el dominio de unión específico bicatenario resultante se selecciona según técnicas de expresión en fago como se ha descrito.

Los anticuerpos dirigidos contra GPNMB descritos en este documento pueden ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (albúmina, otro anticuerpo, etc.), toxina, radioisótopo, agentes citotóxicos o citostáticos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ligarse por reticulación química o por procedimientos recombinantes. Los anticuerpos también pueden ligarse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. Los anticuerpos pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente a un polímero, por ejemplo, para aumentar su semivida en circulación. Los polímeros y los procedimientos a modo de ejemplo para unirlos también se muestran en las patentes de EE.UU. Nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285 y 4.609.546.

Los anticuerpos desvelados también pueden alterarse para tener un patrón de glicosilación que se diferencie del patrón nativo. Por ejemplo, uno o más restos de hidratos de carbono pueden delecionarse y/o uno o más sitios de glicosilación añadirse al anticuerpo original. La adición de sitios de glicosilación a los anticuerpos actualmente desvelados puede llevarse a cabo alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias consenso de sitios de glicosilación conocidas en la técnica. Otro medio para aumentar el número de restos de hidratos de carbono en los anticuerpos es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a los restos de aminoácidos del anticuerpo (documento WO 87/05330; CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 359-306, 1981). La eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono de los anticuerpos puede llevarse a cabo química o enzimáticamente (Arch. Biochem. Biophys., 259: 52,1987; Anal. Biochem., 118: 131, 1981; Meth. Enzymol., 138: 350, 1987). Los anticuerpos también pueden marcarse con una marca detectable o funcional. Las marcas detectables incluyen radiomarcas tales como 131I o 99Tc, que también pueden unirse a anticuerpos usando química convencional. Las marcas detectables también incluyen marcas de enzimas tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Las marcas detectables incluyen adicionalmente restos químicos tales como biotina, que puede detectarse mediante unión a un resto detectable relacionado específico, por ejemplo, avidina marcada.

La valencia de los anticuerpos puede diseñarse a medida para afectar la afinidad y la avidez, el tiempo de retención en sitios de unión (véase, por ejemplo, Am H. Patol, 2002 160:1597-1608; J. Med. Chem. 2002 45:2250-2259; Br. J. Cancer 2002 86:1401-1410; Biomol. Eng. 2001 18:95-108; Int J. Cancer 2002 100:367-374).

Los reactivos de unión de especificidad múltiple (bifuncional) pueden diseñarse basándose en las secuencias específicas para GPNMB de la invención (Biomol. Eng. 2001 18:31-40). Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o ligadura de fragmentos Fab' (Clin. Exp. Immunol. 1990, 79: 315-321; J. Immunol. 199,2148:1547-1553). Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse comprendiendo una especificidad por GPNMB y una segunda especificidad por una segunda molécula usando técnicas que son muy conocidas (Immunol Methods 1994,4:72-81; Wright y Harris, anteriormente; Traunecker y col. 1992 Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52). Los anticuerpos biespecíficos preparados de este modo destruyen selectivamente células que expresan GPNMB.

Los anticuerpos en los que las secuencias de CDR sólo se diferencian insustancialmente de las expuestas en SEQ ID NOs: 22, 24, 26, 31, 33, 35 y las fórmulas: 254, 255 están englobados dentro del alcance de esta invención. Normalmente, un aminoácido está sustituido por un aminoácido relacionado que tiene características de carga, hidrófobas o estereoquímicas similares. Tales sustituciones estarían dentro de las habilidades de un experto. A diferencia de en las CDR, en las FR pueden hacerse cambios más sustanciales sin afectar adversamente las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, pero no se limitan a, manipular ciertos residuos de regiones estructurales que son importantes para el contacto del antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiar la clase o subclase de la región constante, cambiar restos específicos de aminoácidos que pueden alterar la función efectora tal como unión al receptor Fc (patentes de EE.UU. Nos. 5.624.821; 5.648.260; Lund y col. (1991) J. Immun. 147: 2657-2662;Morgan y col. (1995) Immunology 86: 319-324) o cambiar las especies de las que se deriva la región constante.

Un experto en la materia apreciará que los derivados y las modificaciones descritas anteriormente no son exhaustivos, y que muchas otras modificaciones serían obvias para un experto en vista de las enseñanzas de la presente divulgación.

Ácidos nucleicos, clonación y sistemas de expresión

La presente divulgación proporciona además ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos desvelados. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser completa o parcialmente sintéticos o recombinantes. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en este documento engloba una molécula de ADN con la secuencia especificada, y engloba una molécula de ARN con la secuencia especificada en la

que U está sustituido por T, a menos que el contexto lo requiera de otro modo.

Los ácidos nucleicos proporcionados en este documento comprenden una secuencia codificante para una CDR, un dominio variable H y/o un dominio variable L desvelados en este documento.

La presente divulgación también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, fagémidos, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico que codifica una CDR, un dominio variable H y/o un dominio variable L desvelados aquí.

La divulgación proporciona además una célula huésped que comprende uno o más construcciones como antes.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican cualquier CDR (CDR1, CDR2, CDR3 de tanto el dominio variable H como L), dominio variable H o variable L, además de procedimientos para preparar los productos codificados. El procedimiento comprende expresar el producto codificado a partir del ácido nucleico codificado. La expresión puede lograrse cultivando bajo condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Tras la producción por expresión, un dominio variable H o variable L, o miembro de unión específica, puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, luego se usa según convenga.

Pueden aislarse fragmentos de unión a antígeno, dominios variables H y/o variables L y que codifican moléculas de ácidos nucleicos y vectores y/o purificarse a partir de su entorno natural en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

Los sistemas para clonar y expresar un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son muy conocidos en la técnica incluyendo células adecuadas para producir anticuerpos (Gene Expression Systems, Academic Press. eds. Fernandez y col., 1999). Brevemente, células huésped adecuadas incluyen bacterias, células vegetales, células de mamífero y sistemas de levadura y de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de mieloma de ratón NS0, y muchas otras. Un huésped bacteriano común es E. coli. Para producir los anticuerpos desvelados puede usarse cualquier sistema de expresión en proteínas compatible con la invención. Los sistemas de expresión adecuados también incluyen animales transgénicos (Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez y col., 1999).

Pueden elegirse o construirse vectores adecuados de manera que contengan secuencias reguladoras apropiadas que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según convenga. Los vectores pueden ser plásmidos o víricos, por ejemplo, fago, o fagémido, según sea apropiado (véase Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). En la técnica se conocen muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, (Current Protocols in Molecular Biology, 2ª edición, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons, 1992).

La invención también proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico como se desvela en este documento. También se proporciona un procedimiento que comprende introducir tal ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, variolovacuna o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófago. La introducción del ácido nucleico en las células puede seguirse causando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, los anticuerpos de la invención pueden usarse como agente de elección de diana para la administración de otro agente terapéutico o un agente citotóxico para una célula que expresa GPNMB. Un anticuerpo dirigido contra GPNMB acoplado a un agente terapéutico o un agente citotóxico para uso como un medicamento es un aspecto de la invención.

Los anticuerpos dirigidos contra GPNMB están conjugados con un agente terapéutico, tal como un compuesto citotóxico, de forma que el inmunoconjugado resultante ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa GPNMB. Restos particularmente adecuados para la conjugación a anticuerpos son agentes quimioterapéuticos, enzimas conversoras de profármacos o toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra GPNMB puede conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico (véase más adelante) o una toxina (por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria). Alternativamente, el anticuerpo dirigido contra GPNMB puede conjugarse con una enzima conversora de profármacos. La enzima conversora de profármacos puede fusionarse recombinantemente con el anticuerpo o derivado del mismo o conjugarse químicamente al mismo usando procedimientos conocidos. Enzimas conversoras de profármacos a modo de ejemplo son carboxipeptidasa G2, β-

glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β-lactamasa, β-glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Cualquier agente que ejerza un efecto terapéutico sobre células que expresan GPNMB puede usarse como agente para la conjugación a un anticuerpo dirigido contra GPNMB de la invención. Clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, ligandos de unión al surco menor de ADN, inhibidores de la replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores a quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, purimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformantes, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca, o similares.

El agente terapéutico puede ser un agente citotóxico. Agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), ligandos de unión al surco menor de ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), cuocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

En una realización específica, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (dolastatina 10) o un derivado de la misma (por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido). Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAR y MMAE. La síntesis y la estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20030083263; los documentos PCT/US03/24209; PCT/US02/13435; y las patentes de EE.UU. nº 6.323.315; 6.239.104; 6.034065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En una realización específica, el anticuerpo dirigido contra GPNMB 1.15.1 se acopló a monometilauristatina E mediante el enlazante de péptidos intracelular proteasa-valina sensible-citrulina (vcMMAE). Los procedimientos para preparar el inmunoconjugado pueden encontrarse en Doronina S.O. y col., 2003 Nature Biotechnology 21(7):778-794.

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos a proteínas, y en particular, anticuerpos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Arnon y col., 1985 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld y col. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985; Hellstrom y col., 1987 en Controlled Drug Delivery, Robinson y col. eds., Marcel Dekker, Inc., 2ª ed. 1987; Thorpe 1985, en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera y col. eds., EDITOR, 1985; Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin y col. eds., Academic Press 1985; y Thorpe y col., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58).

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos dirigidos contra GPNMB que se unen a células que expresan GPNMB están internalizados y se acumulan en la célula. De este modo, los inmunoconjugados de anticuerpos dirigidos contra GPNMB se acumulan en células que expresan GPNMB. Normalmente, si el inmunoconjugado de anticuerpos dirigidos contra GPNMB está internalizado, el agente es preferencialmente activo. Alternativamente, los inmunoconjugados de anticuerpos dirigidos contra GPNMB no están internalizados y el fármaco es eficaz para reducir o inhibir células que expresan GPNMB mediante la unión a la membrana celular. El agente terapéutico puede conjugarse de un modo que reduzca su actividad, a menos que se separe por escisión del anticuerpo (por ejemplo, mediante hidrólisis o mediante un agente de escisión). En este caso, el agente puede unirse al anticuerpo o derivado del mismo con un enlazante escindible que sea sensible a la escisión en el entorno intracelular de la diana, pero que no sea sustancialmente sensible al entorno extracelular, de forma que el conjugado se escinda del anticuerpo o derivado del mismo cuando sea internalizado por la célula que expresa GPNMB (por ejemplo, en el entorno endosómico o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad a pH o la sensibilidad a proteasas, en el entorno lisosómico o en una caveola).

Un agente terapéutico del inmunoconjugado puede cargarse con respecto a la membrana plasmática (por ejemplo, carga polarizada o neta con respecto a la membrana plasmática), minimizándose así adicionalmente la capacidad del agente para cruzar la membrana plasmática una vez ha sido internalizado por una célula.

El inmunoconjugado de anticuerpos dirigidos contra GPNMB puede comprender una región enlazante entre el agente terapéutico y el anticuerpo. El enlazante puede ser escindible bajo condiciones intracelulares de forma que la escisión del enlazante libere el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular. El enlazante puede ser, por ejemplo, un enlazante de peptidilo que se escinde por una peptidasa intracelular o enzima proteasa que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. Frecuentemente, el enlazante de peptidilo tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, siendo todas conocidas por hidrolizar derivados de fármacos dipeptídicos produciendo la liberación del fármaco activo dentro de células diana (véase Dubowchik y Walker, 1999 Pharm. Therapeutics 83:67-123). Otros enlazantes se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.214.345.

Los enlazantes que pueden ser sensibles al pH pueden hidrolizarse frecuentemente en condiciones ácidas tales como las que se encuentran en el lisosoma (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999 Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville y col., 1989 Biol. Chem. 264:14653-14661). Tales enlazantes son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro tales como aquellas en

la sangre, pero son inestables a pH inferior a 5,5 ó 5,0, el pH del lisosoma. Los enlazantes pueden escindirse bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazante de disulfuro) (véanse, por ejemplo, Thorpe y col., 1987 Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak y col., en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimmagery and Therapy of Cancer, C.W. Vogel ed, Oxford U. Press, 1987; la patente de EE.UU. nº 4.880.935). El enlazante puede ser un enlazante de malonato (Johnson y col., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un enlazante de maleimidobenzoílo (Lau y col., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304) o un análogo de 3'-N-amida (Lau y col., 1995, Bioorg-Med-Chem, 3(10):1305-1312).

Usos profilácticos y terapéuticos de la presente invención

Los anticuerpos de la invención pueden hacer o bien de agonistas o de antagonistas de GPNMB, dependiendo de los procedimientos de su uso. Los anticuerpos pueden usarse para prevenir, diagnosticar o tratar trastornos médicos en un sujeto, especialmente en seres humanos. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para aislar GPNMB o células que expresan GPNMB. Además, los anticuerpos pueden usarse para tratar un sujeto en riesgo de o susceptible a un trastorno o que tiene un trastorno asociado a la expresión o función de GPNMB anómala. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar GPNMB en tales sujetos.

La presente invención proporciona una composición que puede elegir como diana células que expresan GPNMB para uso médico. En particular, la composición se usa para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado a sobreexpresión de GPNMB y/o trastornos hiperproliferativos, particularmente a enfermedad de células hiperproliferativas tal como cáncer. En una realización, la composición comprende un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención y un agente citotóxico. En otra realización, la composición comprende un anticuerpo IgG1 desnudo de la invención y uno o más inmunomoduladores. En todavía otra realización, la composición comprende un anticuerpo Fv monocatenario (anti-GPNMB) conjugado a un agente citotóxico, o un anticuerpo biespecífico que tiene un componente de anticuerpo dirigido contra GPNMB monocatenario y un componente de anticuerpo dirigido contra CD3.

En una realización preferida, la enfermedad de células hiperproliferativas es cáncer. Más preferentemente, el cáncer es melanoma, o un cáncer del sistema SNC tal como astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma, o meningitis neoplásica.

La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra GPNMB para el tratamiento o la prevención de un trastorno caracterizado por o asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB o un síntoma del mismo. El tratamiento o la prevención pueden comprender el uso de uno o más anticuerpos de la invención, o uno o más inmunoconjugados que comprenden uno o más anticuerpos de la invención. El tratamiento o la prevención puede comprender además el uso de una o varias terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de los anticuerpos de la invención.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación de la invención pueden administrarse secuencial o simultáneamente. En una realización específica, las terapias de combinación de la invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención y una cantidad eficaz de al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente de dichos anticuerpos. En ciertas realizaciones, las terapias de combinación de la presente invención mejoran el efecto profiláctico o terapéutico de uno o más anticuerpos de la invención funcionando junto con los anticuerpos para tener un efecto aditivo o sinérgico. En ciertas realizaciones, las terapias de combinación de la presente invención reducen los efectos secundarios asociados a las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos).

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse a un sujeto, preferentemente un sujeto humano, en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse a un sujeto por vías de administración iguales o diferentes.

En una realización específica, una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos de la invención descritos en este documento se administra a un sujeto, preferentemente un ser humano, para prevenir y/o tratar un trastorno caracterizado por o asociado a la expresión y/o actividad anómala de GPNMB o un síntoma del mismo. Según la invención, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para detectar la presencia de GPNMB en muestras biológicas (en procedimientos de diagnóstico o uso como un marcador de eficacia). La cantidad de GPNMB detectada puede guardar relación con el nivel de expresión de GPNMB que, a su vez, guarda relación con la enfermedad, tipo de tumor, carga o estado tumoral usando procedimientos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las recomendaciones del AAPS Ligand Binding Assay Bioanalytical Focus Group (LBABFG) Pharm Res. 2003 Nov; 20(11):1885-900). Los procedimientos de detección que emplean anticuerpos son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, transferencia Western, IHC, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación. Los anticuerpos pueden proporcionarse en un kit de diagnóstico que incorpora una o más de estas técnicas para detectar GPNMB. Un kit tal puede contener otros componentes, envases, instrucciones u otro material para ayudar a la detección de la proteína. En una realización específica, los anticuerpos de

la invención están conjugados a un isótopo radiactivo y se inyectan a un sujeto para detectar células que sobreexpresan GPNMB.

Si los anticuerpos están previstos para fines de diagnóstico, puede ser deseable modificarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (tal como biotina) o un grupo de marcador detectable (tal como un grupo fluorescente, un radioisótopo o una enzima). Si se desea, los anticuerpos de la invención pueden marcarse usando técnicas convencionales. Marcas detectables adecuadas incluyen, por ejemplo, fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos, reactivos con densidad electrónica, enzimas y ligandos que tienen componentes de unión específica. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante puede detectarse por su capacidad para convertir la tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. Para la detección, los componentes de unión adecuados incluyen, pero no se limitan a, biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Otras permutaciones y posibilidades serán rápidamente evidentes para aquellos expertos en la materia, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en procedimientos de cribado para identificar inhibidores de GPNMB eficaces como agentes terapéuticos. En un ensayo de cribado tal, una primera mezcla de unión se forma combinando GPNMB y un anticuerpo de la invención; y se mide la cantidad de unión en la primera mezcla de unión (M_0). También se forma una segunda mezcla de unión combinando GPNMB, el anticuerpo y el compuesto o agente que va a cribarse, y se mide la cantidad de unión de la segunda mezcla de unión (M_1). Un compuesto que va a probarse puede ser otro anticuerpo dirigido contra GPNMB. Entonces se comparan las cantidades de unión en la primera y segunda mezcla de unión, por ejemplo, calculando la relación M_1/M_0. Se considera que el compuesto o agente puede modular las respuestas asociadas a GPNMB si se observa una disminución en la unión de la segunda mezcla de unión con respecto a la primera mezcla de unión. La formulación y la optimización de las mezclas de unión está dentro del nivel de habilidad en la técnica, tales mezclas de unión también pueden contener tampones y sales necesarios para potenciar o para optimizar la unión, y pueden incluirse ensayos de control adicionales en el ensayo de cribado de la invención. Por tanto, los compuestos encontrados que reducen la unión anticuerpo-GPNMB al menos aproximadamente el 10% (es decir, M_1/M_0 <0,9), preferentemente más de aproximadamente el 30%, pueden identificarse y luego, si se desea, cribarse por segunda vez para la capacidad para mejorar un trastorno en otros ensayos o modelos animales como se describe más adelante. La intensidad de la unión entre GPNMB y un anticuerpo puede medirse usando, por ejemplo, un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), tecnología basada en resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, Biacore), siendo todas técnicas muy conocidas en la técnica.

Entonces, el compuesto puede probarse in vitro como se describe en los ejemplos, más adelante.

Dosificación y frecuencia de administración

La cantidad de agente profiláctico o terapéutico o una composición de la invención que será eficaz en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB puede determinarse por procedimientos clínicos convencionales. Por ejemplo, la dosificación de la composición que será eficaz en el tratamiento y/o la prevención de cáncer puede determinarse administrando la composición a un modelo animal. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos in vitro para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. Las dosis preliminares como, por ejemplo, se determinan según ensayos en animales y el escalado de dosificaciones para la administración humana se realiza según las prácticas aceptadas en la técnica. La toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares o estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces logradas en un modelo animal pueden convertirse para uso en otro animal, que incluye seres humanos, usando factores de conversión conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Freineich y col. (1966) Cancer Chemother. Reports, 50(4): 219-244).

La selección de la dosis eficaz preferida puede determinarse (por ejemplo, mediante ensayos clínicos) por un experto basándose en la consideración de varios factores que serán conocidos para un experto en la materia. Tales factores incluyen la enfermedad que va tratarse o prevenirse, los síntomas implicados, la masa corporal del paciente, sexo, estado inmunitario y otros factores conocidos por el experto para reflejar la exactitud de las composiciones farmacéuticas administradas. Un experto en la materia puede seleccionar pautas adecuadas considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, dosificaciones informadas en la bibliografía y recomendadas en el vademécum (59ª ed., 2005).

La dosis precisa que va emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad del cáncer, y debe decidirse según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

Para otros agentes terapéuticos contra el cáncer administrados a un paciente, las dosis típicas de diversos agentes terapéuticos contra el cáncer se conocen en la técnica. Dada la invención, ciertas realizaciones preferidas englobarán la administración de dosificaciones menores en pautas de tratamiento de combinación a las dosificaciones recomendadas para la administración de agentes únicos.

En una realización específica, la dosificación de un anticuerpo o un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención administrado para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) en un paciente es 30 mg/kg o menos, 25 mg/kg o menos, 20 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, preferentemente 12 mg/kg o menos, 11 mg/kg o menos, 10 mg/kg o menos, 9 mg/kg o menos, 8 mg/kg o menos, 7 mg/kg o menos, 6 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 4 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 2 mg/kg o menos, o 1 mg/kg o menos de peso corporal del paciente. En otra realización, la dosificación de un anticuerpo o un inmunoconjugado de la invención administrado para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) en un paciente es una dosis unitaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, preferentemente, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg a 3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a 2 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a 1 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosificación de un anticuerpo o un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención administrado para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB (por ejemplo, cáncer) en un paciente es una dosis unitaria de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg.

En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administra una o más dosis de una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB, en la que la dosis de una cantidad eficaz de dichos anticuerpos, inmunoconjugados, composiciones o terapias de combinación reduce y/o inhibe la proliferación de células cancerosas al menos del 20% al 25%, preferentemente al menos del 25% al 30%, al menos del 30% al 35%, al menos del 35% al 40%, al menos del 40% al 45%, al menos del 45% al 50%, al menos del 50% al 55%, al menos del 55% al 60%, al menos del 60% al 65%, al menos del 65% al 70%, al menos del 70% al 75%, al menos del 75% al 80%, al menos del 80 al 85%, al menos del 85% al 90%, al menos del 90% al 95%, o al menos del 95% al 98% con respecto a un control tal como PBS en un ensayo in vitro y/o in vivo muy conocido en la técnica.

En otras realizaciones, a un sujeto se le administra una o más dosis de una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB, en la que la dosis de una cantidad eficaz logra un título en suero de al menos 0,1 µg/mL, al menos 0,5 µg/mL, al menos 1 µg/mL, al menos 2 µg/mL, al menos 5 µg/mL, al menos 6 µg/mL, al menos 10 µg/mL, al menos 15 µg/mL, al menos 20 µg/mL, al menos 25 µg/mL, al menos 50 µg/mL, al menos 100 µg/mL, al menos 125 µg/mL, al menos 150 µg/mL, al menos 175 µg/mL, al menos 200 µg/mL, al menos 225 µg/mL, al menos 250 µg/mL, al menos 275 µg/mL, al menos 300 µg/mL, al menos 325 µg/mL, al menos 350 µg/mL, al menos 375 µg/mL, o al menos 400 µg/mL de los anticuerpos de la invención. En todavía otras realizaciones, a un sujeto se le administra una dosis de una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención para lograr un título en suero de al menos 0,1 µg/mL, al menos 0,5 µg/mL, al menos 1 µg/mL, al menos, 2 µg/mL, al menos 5 µg/mL, al menos 6 µg/mL, al menos 10 µg/mL, al menos 15 µg/mL, al menos 20 µg/mL, al menos 25 µg/mL, al menos 50 µg/mL, al menos 100 µg/mL, al menos 125 µg/mL, al menos 150 µg/mL, al menos 175 µg/mL, al menos 200 µg/mL, al menos 225 µg/mL, al menos 250 µg/mL, al menos 275 µg/mL, al menos 300 µg/mL, al menos 325 µg/mL, al menos 350 µg/mL, al menos 375 µg/mL, o al menos 400 µg/mL de los anticuerpos, y una dosis posterior de una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se administra para mantener un título en suero de al menos 0,1 µg/mL, al menos 0,5 µg/mL, al menos 1 µg/mL, al menos, 2 µg/mL, al menos 5 µg/mL, al menos 6 µg/mL, al menos 10 µg/mL, al menos 15 µg/mL, al menos 20 µg/mL, al menos 25 µg/mL, al menos 50 µg/mL, al menos 100 µg/mL, al menos 125 µg/mL, al menos 150 µg/mL, al menos 175 µg/mL, al menos 200 µg/mL, al menos 225 µg/mL, al menos 250 µg/mL, al menos 275 µg/mL, al menos 300 µg/mL, al menos 325 µg/mL, al menos 350 µg/mL, al menos 375 µg/mL, o al menos 400 µg/mL. Según estas realizaciones, a un sujeto puede administrársele 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más dosis posteriores.

En una realización específica, los anticuerpos inmunoconjugados de la invención se usan en una dosis unitaria de al menos 0,01 mg/kg, al menos 0,1 mg/kg, al menos 0,2 mg/kg, al menos 0,4 mg/kg, al menos 0,6 mg/kg, al menos 0,8 mg/kg, al menos 1 mg/kg, o al menos 1,1 mg/kg de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención. En otra realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se usan en una dosis unitaria de al menos 0,01 mg/kg, al menos 0,1 mg/kg, al menos 0,2 mg/kg, al menos 0,4 mg/kg, al menos 0,6 mg/kg, al menos 0,8 mg/kg, al menos 1 mg/kg, o al menos 1,1 mg/kg de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención una vez cada 7 días, preferentemente, una vez cada 10 días, una vez cada 12 días, una vez cada 14 días, una vez cada 16 días, una vez cada 18 días, una vez cada tres semanas, o una vez al mes. En una realización preferida, un inmunoconjugado de la presente invención se usa a una dosis unitaria de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg una vez cada 10 a 20 días con 2 a 4 ciclos.

El tratamiento o la prevención de un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB puede comprender: (a) administrar a un sujeto en necesidad del mismo una o más dosis de una

cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención; y (b) monitorizar el nivel/concentración en plasma de dicho anticuerpo o anticuerpos administrados en dicho sujeto después de la administración de un cierto número de dosis de dicho anticuerpo o anticuerpos. Además, preferentemente, dicho cierto número de dosis es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención.

El tratamiento o la prevención de un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB puede comprender: (a) administrar a un sujeto en necesidad del mismo una dosis de al menos 0,1 mg/kg (preferentemente al menos al menos 0,2 mg/kg, al menos 0,4 mg/kg, al menos 0,6 mg/kg, al menos 0,8 mg/kg, al menos 1 mg/kg, o al menos 1,1 mg/kg) de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención; y (b) administrar una o más dosis posteriores a dicho sujeto cuando el nivel en plasma del anticuerpo o anticuerpos administrados en dicho sujeto sea inferior a 0,1 µg/mL, preferentemente inferior a 0,25 µg/mL, inferior a 0,5 µg/mL, inferior a 0,75 µg/mL, o inferior a 1 µg/mL. El tratamiento o la prevención de un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB puede comprender: (a) administrar a un sujeto en necesidad del mismo una o más dosis de al menos al menos 0,1 mg/kg (preferentemente al menos al menos 0,2 mg/kg, al menos 0,4 mg/kg, al menos 0,6 mg/kg, al menos 0,8 mg/kg, al menos 1 mg/kg, o al menos 1,1 mg/kg) de uno o más anticuerpos de la invención; (b) monitorizar el nivel en plasma del anticuerpo o anticuerpos administrados de la invención en dicho sujeto después de la administración de un cierto número de dosis; y (c) administrar una dosis posterior del anticuerpo o anticuerpos de la invención cuando el nivel en plasma del anticuerpo o anticuerpos administrados en dicho sujeto sea inferior a 0,1 µg/ml, preferentemente inferior a 0,25 µg/mL, inferior a 0,5 µg/mL, inferior a 0,75 µg/mL, o inferior a 1 µg/mL. Preferentemente, dicho cierto número de dosis es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis de una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) distintas de anticuerpos o inmunoconjugados de la invención que han sido o actualmente están siendo usadas para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos o inmunoconjugados de la invención para tratar y/o prevenir un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB. Preferentemente, las dosificaciones de agentes profilácticos o terapéuticos usados en las terapias de combinación de la invención son inferiores a las que han sido o actualmente están siendo usadas para prevenir y/o tratar un trastorno asociado a o caracterizado por la expresión y/o actividad anómala de GPNMB.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) pueden administrarse separadas menos de 5 minutos, separadas menos de 30 minutos, separadas 1 hora, separadas aproximadamente 1 hora, separadas aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas, separadas aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, separadas aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, separadas aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, separadas aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, separadas aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, separadas aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, separadas aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, separadas aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, separadas aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, separadas aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, separadas aproximadamente 12 horas a 18 horas, separadas 18 horas a 24 horas, separadas 24 horas a 36 horas, separadas 36 horas a 48 horas, separadas 48 horas a 52 horas, separadas 52 horas a 60 horas, separadas 60 horas a 72 horas, separadas 72 horas a 84 horas, separadas 84 horas a 96 horas, o separadas 96 horas a 120 horas. Preferentemente, dos o más terapias se administran dentro de la misma visita del paciente.

Uno o más anticuerpos de la invención y una o varias terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) puede administrarse cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, opcionalmente seguido de la administración de una tercera terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, etc., y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

Composiciones farmacéuticas y procedimientos de administración

La divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos dirigidos contra GPNMB. Tales composiciones pueden ser adecuadas para uso farmacéutico y administración a pacientes. Las composiciones comprenden normalmente uno o más anticuerpos de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La frase “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas complementarias, adicionales o potenciadas. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los procedimientos para realizar la administración son conocidos para aquellos expertos en la materia. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica. También puede ser posible obtener composiciones que pueden administrarse tópicamente o por vía oral, o que pueden transmitirse a través de las membranas mucosas.

Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación intradérmica o subcutánea normalmente incluyen uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Tales preparaciones pueden encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles o dispersión. Para administración intravenosa, vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y deber ser fluida hasta el punto que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares; polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para administración por vía oral, los anticuerpos pueden combinarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Los aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de naturaleza similar; un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente de disgregación tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para permear la barrera. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando pastillas para chupar, pulverizadores nasales, inhaladores o supositorios. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos que comprenden la porción Fc, las composiciones pueden transmitirse a través de las mucosas al intestino, la boca o los pulmones (por ejemplo, mediante la ruta mediada por los receptores FcRn como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.030.613). Para administración transdérmica, los compuestos activos pueden formularse en pomadas, bálsamos, geles o cremas como generalmente se conoce en la técnica. Para administración por inhalación, los anticuerpos pueden administrarse en forma de un pulverizador de aerosol de un recipiente a presión o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos actualmente desvelados se preparan con vehículos que protegerán al compuesto de la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. También pueden usarse suspensiones liposómicas que contienen los anticuerpos actualmente desvelados como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse según procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, como se describen en la patente de EE.UU. nº 4.522.811.

Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. El término “forma unitaria de dosificación” como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La toxicidad y eficacia terapéutica de la composición de la invención puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50}. Se prefieren composiciones que presenten grandes índices terapéuticos.

Para cualquier composición usada en la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivos celulares. Ejemplos de bioensayos adecuados incluyen ensayos de replicación de ADN, ensayos clonogénicos y otros ensayos como, por ejemplo, se describen en los ejemplos. Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivos celulares y los estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del anticuerpo que logra una inhibición del 50% de los síntomas). Los niveles en circulación en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosificación particular pueden monitorizarse mediante un bioensayo adecuado. La dosificación se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada.

Los anticuerpos pueden modificarse para convertirse en inmunotoxinas utilizando técnicas que son muy conocidas en la técnica (Vitetta 1993, Immunol Today 14:252; patente de EE.UU. nº 5.194.594). Los inmunoconjugados citotóxicos se conocen en la técnica y se han usado como agentes terapéuticos. Tales inmunoconjugados pueden usar, por ejemplo, maitansinoides (documento US 6.441.163), inhibidor de la polimerización de tubulina, auristatina (Mohammad y col., 1999 Int. J. Oracol 15(2):367-72; Doronina y col., 2003 Nature Biotechnology 21(7): 778-784), derivados de dolastatina (Ogawa y col., 2001 Toxicol Lett. 121(2):97-106) 21(3)778-784), Mylotarg® (Wyeth Laboratories, Filadelfia, PA); maitansinoides (DM1), taxano o mertansina (ImmunoGen Inc.).

Los productos inmunorradiofarmacéuticos que utilizan anticuerpos dirigidos contra GPNMB pueden prepararse utilizando técnicas que son muy conocidas en la técnica (Junghans y col. en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996); las patentes de EE.UU. Nos. 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902). Cada una de las inmunotoxinas y moléculas de anticuerpo radiomarcadas destruyen selectivamente células que expresan GPNMB. Las radiomarcas se conocen en la técnica y se han usado para radioinmunoconjugados diagnósticos o terapéuticos. Ejemplos de radiomarcas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{105}Rh, renio 186, renio 188, samario 153, cobre 64, escandio 47). Por ejemplo, los radionúclidos que se han usado en diagnóstico clínico guiado por radioinmunoconjugados incluyen, pero no se limitan a: ^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{99}Tc, ^{67}Ga, además de ^{111}In. Los anticuerpos también se han marcado con una variedad de radionúclidos para el posible uso en inmunoterapia dirigida (véase Peirersz y col., 1987). Estos radionúclidos incluyen, por ejemplo, 188Re y 186Re, además de 90Y, y a un menor grado 199Au y 67Cu. I-(131) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.460.785). Los quelantes radioterapéuticos y conjugados quelantes se conocen en la técnica (documentos U.S. 4.831.175, 5.099.069, 5.246.692, 5.286.850 y 5.124.471).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, que incluyen los experimentos realizados y los resultados logrados, se proporcionan sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1: Inmunógeno

El clon de GPNMB humano recombinante CG56972 (SEQ ID NO:289), específicamente el dominio extracelular (ECD), se preparó para uso como inmunógeno. Generalmente, el ADNc que codifica el ECD de GPNMB con una marca de V5-HIS del extremo C se transfectó en células HEK 293, se expresó y se purificó usando cromatografía de intercambio catiónico con POROS HS 50 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La muestra se eluyó con NaCl 1 M a un pH de 5,5, seguido de cromatografía de afinidad de metales (5 mL de quelato metálico de Pharmacia). La muestra se eluyó contra un gradiente lineal de imidazol 10-500 mM durante 10 VC (volumen de columna). La diálisis se produjo usando Tris 20 mM/NaCl 50 mM a pH 7,4 (2 L x 2). Entonces, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

Ejemplo 2: Inmunización

Un procedimiento preferido para generar anticuerpos completamente humanos usa cepas de XenoMouse® de ratones que han sido genomanipulado para contener fragmentos de la configuración de la línea germinal de 245 kb y 190 kb de tamaño del locus de cadena pesada humana y el locus de cadena ligera kappa (Green y col. 1994 Nature Genetics 7:13-21; Mendez y col. 1997 Nature Genetics 15:146-156; Green y Jakobovits, 1998 J. Exp. Med. 188:483-495; patentes de EE.UU. Nos. 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598.) En una solución alternativa, la solución de minilocus, un locus de Ig exógena se imita mediante la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por tanto, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal (Taylor y col., 1992, Chen y col., 1993, Tuaillon y col., 1993, Choi y col., 1993, Lonberg y col., (1994), Taylor y col., (1994) y Tuaillon y col., (1995), Fishwild y col., (1996); las patentes de EE.UU. Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299, 6.255.458,

5.591.669, 6.023.010, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, 5.643.763, 5.981.175). Se entiende que XenoMouse® de λκ puede usarse para generar anticuerpos dirigidos contra GPNMB que utilizan regiones V lambda. Tales anticuerpos están dentro del alcance de la invención.

Inmunización

Como antígeno se usó el inmunógeno GPNMB-V5His (como se prepara en el Ejemplo 1). Los anticuerpos monoclonales contra GPNMB se desarrollaron inmunizando secuencialmente ratones XenoMouse® (cepa XMG2 de XenoMouse®), Abgenix, Inc. Fremont, CA. Los animales XenoMouse® se inmunizaron mediante la vía de la almohadilla plantar para todas las inyecciones. El volumen total de cada inyección fue 50 µl por ratón, 25 µl por almohadilla plantar.

Para la cohorte 1 (10 ratones XMG2), la inmunización inicial fue con 10 µg de GPNMB-V5H mezclado 1:1 (v/v) con 100 µg de gel de alumbre ("Adju-Phos": adyuvante de gel de fosfato de aluminio, Superfos BIOSECTOR™ a/s, distribuido por E.M. Sergent Pulp and Chemical Co., Clifton, NJ, nº de cat. 1452-250) por ratón. Los cinco refuerzos posteriores se hicieron con 5 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 (v/v) con 100 µg de gel de alumbre en D-PBS libre de pirógenos. El séptimo refuerzo consistió en 5 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD® (Sigma; nº de cat. T2684). La octava inyección consistió en 5 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 v/v con 100 µg de gel de alumbre. Se hizo un refuerzo final con 5 µg de GPNMB-V5His en DPBS libre de pirógenos, sin adyuvante. Los ratones XenoMouse® se inmunizaron en los días 0, 3, 6, 10, 14, 17, 23 y 27 para este protocolo y las fusiones se realizaron en el día 31. El sangrado se hizo mediante el procedimiento de sangrado retro-orbital en el día 21 después del sexto refuerzo.

Para la cohorte 2 (10 ratones XMG2), la inmunización inicial fue con 10 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 (v/v) con 100 µg de gel de alumbre por ratón. Los dos refuerzos posteriores se hicieron con 5 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 (v/v) con 100 µg de gel de alumbre en D-PBS libre de pirógenos. El cuarto refuerzo consistió en 5 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 (v/v) con TITERMAX GOLD® (Sigma; nº de cat. T2684). Las siguientes quinta a séptima inyecciones consistieron en 5 µg de GPNMB-V5His mezclado 1:1 v/v con 100 µg de gel de alumbre. La octava inyección y el refuerzo final se hizo con 5 µg de GPNMB-V5His en DPBS libre de pirógenos, sin adyuvante. Los ratones XenoMouse® se inmunizaron en los días 0, 3, 7, 11, 14, 17, 22, 25 y 74 para este protocolo y las fusiones se realizaron en el día 78. El sangrado se hizo mediante el procedimiento de sangrado retro-orbital en el día 21 después del sexto refuerzo.

La inyección en las almohadillas plantares se realizó mediante el siguiente protocolo usando sólo la superficie ventral de ambas patas de las extremidades traseras. Se inyectó una disolución debajo de la piel sin atravesar el tejido muscular usando una jeringuilla de 1/2 ml de insulina con una aguja de 28 ó 30 de calibre x 1/2" unida. El ratón que iba a inyectarse se agarró por el pelaje suelto a lo largo de su cuello y lomo de manera que se inmovilizó y así se giró de forma que el lado ventral estuviera accesible. La extremidad trasera se agarró y se insertó la aguja (lado biselado hacia arriba) en el tobillo, pasando justamente por debajo de la piel hasta que la aguja alcanzó la pata. La aguja se insertó a lo largo de la longitud exterior de la pata trasera suavemente para evitar la vena localizada detrás de la cara interna de la pata. Una vez la punta de la aguja alcanzó la pata, la disolución se inyectó lentamente hasta que faltó resistencia o se había dispensado el volumen designado. Entonces, la aguja se extrajo y la segunda pata trasera se inyectó del mismo modo.

La siguiente Tabla 4 proporciona el programa de inmunización para los 2 grupos de ratones.

Tabla 4: Programa de inmunización de antígeno de GPNMB: GPNMB soluble a 0,43 mg/ml

Diana	Grupo nº	Modo de inmunización		Nº de ratones	Antígeno	1ª inyección	2º refuerzo
GPNMB	1	Almohadilla plantar		10	GPNMB soluble	10 ug/ratón de gel de alumbre Día 0	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 3

3º refuerzo	4º refuerzo	5º refuerzo	6º refuerzo	Sangrado	7º refuerzo	8º refuerzo	Fusión
5 ug/ratón de gel de alumbre Día 6	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 10	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 14	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 17	Día 21	5 ug/ratón de Titermax Gold Día 23	10 ug/ratón de D-PBS Día 27	Día 31

Diana	Grupo nº	Modo de inmunización		Nº de ratones	Antígeno	1ª inyección	2º refuerzo
GPNMB	2	Almohadilla plantar		10	GPNMB soluble	10 ug/ratón de gel de alumbre Día 0	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 3

3º refuerzo	4º refuerzo	5º refuerzo	6º refuerzo	Sangrado	7º refuerzo	8º refuerzo	9º refuerzo	Fusión
5 ug/ratón de gel de alumbre Día 7	5 ug/ratón de Titermax Gold Día 11	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 14	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 17	Día 21	5 ug/ratón de gel de alumbre Día 22	10 ug/ratón de D-PBS Día 25	10 ug/ratón de D-PBS Día 100	Día 104

Selección de animales para la recogida por título

Los títulos de anticuerpos dirigidos contra GPNMB en el suero de ratones XenoMouse® inmunizados se determinaron por ELISA. Brevemente, se establecieron tres conjuntos de ELISA. GPNMB (+NMB) a 1 µg/mL, GPNMB (-NMB) a 1 µg/mL y NMB a 1 µg/mL se recubrieron sobre placas de 96 pocillos de poliestireno Costar Labcoat Universal Binding (Corning, Acton, MA) durante la noche a 4ºC en tampón de recubrimiento con antígeno (tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, NaHCO3 (PM 84) 8,4 g/L). Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,05% en 1 x PBS) usando un lavador de placas Biotek. Entonces, las placas se bloquearon con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%, timerosal al 0,01% en 1 x PBS) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después del bloqueo de una hora, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado usando un lavador de placas Biotek. Los sueros de tanto los ratones XenoMouse® inmunizados con GPNMB como de los animales XenoMouse® sin tratamiento se valoraron en BSA al 0,5%/tampón PBS a diluciones 1:3 por duplicado a partir de una disolución 1:100 inicial. El último pocillo se dejó en blanco. Estas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h, y luego las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado usando un lavador de placas Biotek. Se añadió un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Pierce, Rockford, IL) específica de Fc a una concentración final de 1 µg/mL y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado usando un lavador de placas Biotek. Después del lavado, las placas se revelaron con la adición de sustrato cromogénico TMB (BioFx BSTP-0100-01) durante 10-20 min o hasta que los pocillos de control negativo empezaran a mostrar color. Entonces, el ELISA se detuvo mediante la adición de disolución de parada (reactivo de parada 650 nM para TMB (BioFx BSTP-0100-01) reconstituido con 100 ml de H2O por botella). El título específico de cada animal XenoMouse® se determinó a partir de la densidad óptica a 650 nm y se muestra en las Tablas 2 y 3 a continuación. El valor del título es el recíproco de la mayor dilución de sueros con una lectura de DO doble de la del ruido. Por tanto, cuanto mayor sea el número, mayor será la respuesta inmunitaria humoral a GPNMB. Los resultados se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: Títulos en suero dirigido contra GPNMB de XENOMOUSE®

Ratones del grupo 1, fusión en el día 21 después de 6 inyecciones.			
Ratón ID	Reactividad a GPNMB	Reactividad a GPNMB (+GPNMB)	Reactividad a GPNMB
	Títulos mediante hIgG	Títulos mediante hIgG	Títulos mediante hIgG
1-1	20.000	5.000	225
1-2	5.000	800	200
1-3	35.000	7.500	225
1-4	75.000	22.000	225
1-5	8.000	2.000	325

1-6	6.000	800	1800
1-7	22.000	7.500	225
1-8	6.000	2.000	200
1-9	7.000	2.000	75
1-10	22.000	7.500	200
1-NC1	<100	<100	<100
1-NC2	<100	<100	<100
Ratones del grupo 2, sangrado en el día 21 después de 6 inyecciones			
Ratón ID	Reactividad a GPNMB (-GPNMB)	Reactividad a GPNMB (+GPNMB)	Reactividad a GPNMB
	Títulos mediante hIgG	Títulos mediante hIgG	Títulos mediante hIgG
2-1	100.000	2.600	50
2-2	8.000	2.600	50
2-3	15.000	4.000	50
2-4	7.000	2,200	75
2-5	22.000	6.500	250
2-6	60.000	22.000	60
2-7	19.000	7.000	50
2-8	5.000	1.200	50
2-9	16.000	3.500	110
2-10	12.000	5.000	110
2-NC1	<100	<100	<100
2-NC2	<100	<100	<100

Los sueros dirigidos contra GPNMB reunidos de animales inmunizados también se evaluaron por FACS para la reactividad a las líneas celulares UACC-62, SF539, SKMEL5, U87MG y LOX1 MVI. Los sueros reunidos se probaron a 1:10, 1:100 y 1:500 en comparación con el suero dirigido contra IL13 (control) y presangrados diluidos a 1:10, 1:100 (control).

Ejemplo 3: Anticuerpos

Las líneas celulares de hibridoma se generaron a partir de ratones inmunizados que demostraron tener títulos dirigidos contra GPNMB usando técnicas convencionales (véase Mendez y col., 1997, Nat Genet. 15:146-156).

Los ratones inmunizados se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se recogieron y se reunieron los ganglios linfáticos de cada cohorte. Las células linfoides se disociaron mediante molienda en DMEM para liberar las células de los tejidos, y las células se suspendieron en DMEM. Las células se contaron y se añadieron 0,9 ml de DMEM por 100 millones de linfocitos al sedimento de células para resuspender las células suavemente, pero completamente. Usando 100 µl de perlas magnéticas CD90+ por 100 millones de células, las células se marcaron incubando las células con las perlas magnéticas a 4ºC durante 15 minutos. La suspensión de células magnéticamente marcadas que contenía hasta 10^8 células positivas (o hasta $2x10^9$ células totales) se cargó sobre una columna de LS+ y la columna se lavó con

DMEM. El efluente total se recogió como la fracción negativa para CD90 (se esperaba que la mayoría de estas células fueran células B).

La fusión se realizó mezclando las células B enriquecidas lavadas de antes y células de mieloma no secretor P3X63Ag8.653 comprado de ATCC, nº de cat. CRL 1580 (Kearney y col., J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) a una relación de 1:1. La mezcla de células se suspendió suavemente por centrifugación a 800 g. Después de la eliminación completa del sobrenadante, las células se trataron con 2-4 mL de disolución de Pronase (CalBiochem, nº de cat. 53702; 0,5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 minutos. Entonces se añadieron 3-5 ml de SBF para detener la actividad enzimática y la suspensión se ajustó a 40 ml de volumen total usando disolución de fusión de Electro cell, ECFS (sacarosa 0,3 M, Sigma, nº de cat. S7903, acetato de magnesio 0,1 mM, Sigma, nº de cat. M2545, acetato de calcio 0,1 mM, Sigma, nº de cat. C4705). El sobrenadante se eliminó después de la centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml de ECFS. Esta etapa de lavado se repitió y las células se resuspendieron de nuevo en ECFS a una concentración de $2x10^6$ células/ml.

La fusión en Electro cell se realizó usando un generador de fusiones, modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA. El tamaño de la cámara de fusión usada era 2,0 mL, usando los parámetros del instrumento Abgenix, Inc. óptimos para hacer la ECF.

Después de la ECF, la suspensión de células se sacó suavemente de la cámara de fusión bajo condiciones estériles y se transfirió a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de medio de cultivo de hibridomas (DMEM (JRH Biosciences), SBF al 15% (Hyclone) complementado con L-glutamina, pen/estrep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) y IL-6 (Boehringer Mannheim)). Las células se incubaron durante 15-30 minutos a 37ºC y luego se centrifugaron a 400 g (1000 rpm [pero, ¿en qué rotor?, de otro modo, quitar las rpm]) durante cinco minutos. Las células se resuspendieron suavemente en un pequeño volumen de medio de selección de hibridomas (medio de cultivo de hibridomas complementado con 0,5 x HA (Sigma, nº de cat. A9666)) y el volumen se ajustó apropiadamente con más medio de selección de hibridomas basado en una siembra final de $5x10^6$ células B totales por placa de 96 pocillos y 200 µl por pocillo. Las células se mezclaron suavemente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer. En el día 7 ó 10, la mitad del medio se eliminó y las células se volvieron a alimentar con medio de selección de hibridomas.

Después de 14 días de cultivo, los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para anticuerpos monoclonales específicos para GPNMB. En el cribado primario, las placas de ELISA (Fisher, nº de cat. 12-565-136) se recubrieron con 50 µL/pocillo de GPNMB (1 µg/mL) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, $NaHCO_3$ 8,4 g/L), luego se incubaron a 4ºC durante la noche. Después de la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS) tres veces. Se añadieron 200 µL/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%, timerosal al 0,01% en 1 x PBS) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado tres veces. Se añadieron alícuotas (50 µl/pocillo) de sobrenadantes de hibridoma y de controles positivos y negativos y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. El control positivo usado fue suero del ratón XenoMouse® inmunizado con GPNMB pertinente y el control negativo fue suero de la cepa pertinente inmunizada con KLH del ratón XenoMouse®. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpo de detección de cabra dirigido contra huIgGfc-HRP (Caltag, nº de cat. H10507, usando una concentración de dilución 1:2000) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl/pocillo de TMB (BioFX Lab. Nº de cat. TMSK-0100-01) y las placas se dejaron revelar durante aproximadamente 10 minutos (hasta que los pocillos de control negativo apenas empezaron a mostrar color). Entonces se añadió disolución de parada de 50 µl/pocillo (disolución de parada de TMB (BioFX Lab. Nº de cat. STPR-0100-01) y las placas se leyeron en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

Los antiguos sobrenadantes de cultivo de los pocillos de crecimiento de células de hibridoma basados en el cribado primario se eliminaron completamente y las células de hibridoma positivas IL-1b se suspendieron en medio de cultivo de hibridomas nuevo y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Después de 2 días en cultivo, estos sobrenadantes estuvieron listos para un cribado de confirmación secundario. En el cribado de confirmación secundario, los positivos en el primer cribado se cribaron en ELISA de unión a GPNMB descrito como anteriormente, y dos conjuntos de sistema de detección para el ELISA de confirmación secundario, un conjunto para la detección de hIgG, un conjunto para la detección de la cadena ligera kappa de Ig humana (anticuerpo de cabra dirigido contra hIg kappa-HRP , Southern Biotechnology, nº de cat. 2060-05) con el fin de demostrar la composición completamente humana para tanto las cadenas pesadas como ligeras. Los dos conjuntos de procedimientos de ELISA fueron idénticos a las descripciones anteriores, excepto que los tres anticuerpos de detección diferentes se usaron por separado. Todos los éxitos positivos del ensayo de ELISA de la confirmación secundaria se cribaron en un contador para la unión a inmunógeno por ELISA con el fin de excluir aquellos que reaccionaban de forma cruzada con IL-1a. Las placas de ELISA (Fisher, nº de cat. 12-565-136) se recubrieron con 50 µL/pocillo de proteína de fusión V5His irrelevante, 1 ug/mL en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, $NaHCO_3$ 8,4 g/l), luego se incubaron a 4ºC durante la noche. El resto de los procedimientos fueron idénticos a las descripciones anteriores. Hay 33 anticuerpos monoclonales específicos para GPNMB completamente humanos que se generaron.

Los sobrenadantes de hibridomas se cribaron para la unión a GPNMB por ELISA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad dirigida contra GPNMB de hibridomas.

	3 µg/mL	1 µg/mL	333 ng/mL	111 ng/mL	37 ng/mL	12,3 ng/mL
	DO promedio	DO promedio	DO promedio	DO promedio	DO promedio	DO promedio
1.2.2	0,763	0,499	0,356	0,199	0,094	0,049
1.7.3	1,003	0,871	0,760	0,451	0,239	0,094
1.15.1	1,159	1,051	0,902	0,701	0,381	0,168
1.16.2	0,036	0,015	0,010	0,008	0,008	0,007
2-3	1,282	1,204	0,963	0,713	0,359	0,179
2-6	1,254	1,295	1,092	0,875	0,443	0,183
2-7	0,827	0,719	0,680	0,494	0,308	0,156
2-8	0,921	0,635	0,229	0,109	0,056	0,028
2-10	1,095	1,066	0,849	0,583	0,272	0,132
2-15	0,601	0,568	0,578	0,395	0,246	0,127
2-16	0,359	0,173	0,068	0,032	0,017	0,011
2-17	0,053	0,019	0,010	0,009	0,008	0,011
2-22	0,714	0,707	0,538	0,355	0,171	0,068
2-24	0,060	0,042	0,028	0,023	0,016	0,017
Control de isotipo	0,009	0,008	0,009	0,009	0,009	0,011
Anticuerpo irrelevante	0,009	0,008	0,012	0,013		
Control de Ab secundario	0,011					
Control de Ab anti-V5	3,066					

Se analizaron ciertos sobrenadantes de células de hibridoma (29) para la unión a GPNMB mediante el biosensor BiaCore® 2000 equipado con un chip sensor CM5 de calidad para investigación. Una dilución 1:25 de sobrenadante de células se pasó por una superficie de proteína A durante 5 min seguido por lavado de la superficie durante 10 min. Posteriormente se inyectó GPNMB durante 90 s sobre la superficie a una concentración de 880 nM seguido por disociación. Los datos de unión de doble referencia se obtuvieron restando la señal de una célula de flujo de control y restando la desviación inicial de un tampón inyectado justo antes de la inyección de antígeno. Los datos de unión a GPNMB para cada mAb se normalizaron a la cantidad de mAb capturado en cada superficie. También se midieron respuestas corregidas de desviación normalizada. Los sensogramas se ajustaron a un modelo cinético simple 1:1. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Dieciséis de los sobrenadantes de células contuvieron mAb que se unió significativamente a GPNMB, y tres mAb, 15.1, 15.2 y 15.3 mostraron una fuerte unión a GPNMB.

Tabla 7

Muestra	Kd (nM)	ka (M-1s-1)	kd (s-1)	Nivel de expresión
15,1	52	16524	8,55E-04	medio
15,3	59	13417	7,97E-04	medio
15,2	61	12635	7,70E-04	alto
2,2	96	9257	8,90E-04	medio
10,2	118	3955	4,66E-04	bajo
7,3	121	9648	1,17E-03	medio
7,1	122	11842	1,44E-03	medio
7,2	141	9356	1,32E-03	alto
10,3	147	3626	5,32E-04	bajo
10,1	209	4235	8,85E-04	bajo
8,2	242	7555	1,83E-03	medio
8,3	264	6551	1,73E-03	bajo
8,1	329	6830	2,25E-03	medio
12,3	407	1549	6,31 E-04	medio
12,2	435	1280	5,57E-04	medio
12,1	630	1587	1,00E-03	bajo
1,1	>1000	<1500	nd	alto
1,2	>1000	<1500	nd	alto
1,3	>1000	<1500	nd	medio
2,1	>1000	<1500	nd	medio
5,1	>1000	<1500	nd	medio
5,2	>1000	<1500	nd	medio
5,3	>1000	<1500	nd	medio
9,1	>1000	<1500	nd	medio
9,2	>1000	<1500	nd	bajo
9,3	>1000	<1500	nd	bajo
11,1	>1000	<1500	nd	bajo
11,2	>1000	<1500	nd	bajo
11,3	>1000	<1500	nd	bajo

Ejemplo 4: Agrupamiento de anticuerpos

Ciertos anticuerpos descritos en este documento se agruparon según el protocolo descrito en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20030157730. Se preparan perlas conjugadas con MxhIgG para el acoplamiento al anticuerpo primario. El volumen de sobrenadante necesario se calcula usando la siguiente fórmula: (n+10) x 50 µL (en la que n = número total de muestras en la placa). Si se conoce la concentración se usa 0,5 µg/mL. La reserva de perlas se remueve suavemente con vórtex, luego se diluye en el sobrenadante a una concentración de 2500 de cada perla por pocillo o $0,5x10^5$ /ml y se incuba en un agitador en la oscuridad a TA durante la noche, o 2 horas si es a una concentración conocida de 0,5 µg/mL. Tras la aspiración se añaden 50 µL de cada perla a cada pocillo de la placa de filtración, luego se lavan una vez añadiendo 100 µL/pocillo de tampón de lavado y se aspiran. El antígeno y los controles se añaden a la placa de filtración a 50 µL/pocillo, luego se cubren y se dejan incubar en la oscuridad durante 1 hora en el agitador. Tras una etapa de lavado se añade un anticuerpo secundario desconocido a 50 µL/pocillo usando la misma dilución (o concentración si se conoce) como se ha usado para el anticuerpo primario. Entonces, las placas se incuban en la oscuridad durante 2 horas a TA en el agitador seguido por una etapa de lavado. A continuación se añaden 50 µL/pocillo de mxhIgG biotinilada diluida 1:500 y se deja incubar en la oscuridad durante 1 hora en el agitador a TA. Tras una etapa de lavado se añaden 50 µL/pocillo de estreptavidina-PE a 1:1000 y se deja incubar en la oscuridad durante 15 minutos en el agitador a TA. Tras una etapa de lavado, cada pocillo se resuspende en 80 µL de tampón de bloqueo y se lee usando Luminex. Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales pertenecen a distintas agrupaciones. La unión competitiva por anticuerpos de diferentes agrupaciones apoya la especificidad de anticuerpos por epítopos similares o adyacentes. La unión no competitiva apoya la especificidad de anticuerpos por epítopos únicos.

Se crearon tres agrupamientos para probar adicionalmente la unión de seis anticuerpos dirigidos contra GPNMB. El agrupamiento 1 incluyó los anticuerpos GPNMB (1.2.1), (1.10.1) y (2.22.1). El agrupamiento 2 incluyó los anticuerpos GPNMB (2.3.1) y (1.15.1) y el agrupamiento 3 incluyó el anticuerpo GPNMB (2.10.1). Los resultados de los ensayos de agrupamiento se proporcionan a continuación en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8

	BB	**1.1**	**1.2**	**1.3**	**1.5**	**1.7**	**1.8**	**1.9**	**1.11**	**1.12**	**1.13**	**1.15**	**xV5**
BB	0	16	58	24	6	25	14	9	8	9	7	15	32
1.1	-16	0	57	16	-29	34	9	-35	-9	-7	-24	35	28
1.2	-42	-16	0	-60	-89	-49	-81	-75	-73	-65	-81	-43	45
1.3	-11	-33	8	0	-75	-40	-49	171	-29	-33	-67	-73	-15
1.5	25	35	64	60	0	20	10	24	17	27	12	-8	61
1.7	-1	76	65	20	-8	0	-8	4	4	6	-3	-3	95
1.8	-7	29	45	35	-3	-7	0	4	-1	0	-6	3	52
1.9	-5	18	47	-7	-10	3	4	0	4	5	-5	-1	17
1.11	18	40	60	29	-11	1	15	16	0	8	5	-23	48
1.12	-10	26	43	27	-5	3	-12	-4	-12	0	-9	-13	57
1.13	1	30	40	27	2	9	2	10	11	17	0	-13	59
1.15	-19	91	79	71	15	21	8	12	10	15	13	0	89
xV5	41	134	239	46	5	443	230	-1	70	257	24	535	0
	I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**		**IX**			
	1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.8	1.9	1.15		xV5			
				1.13		1.11							
						1.12							

Tabla 9

	1.1	**1.2**	**1.3**	**1.5**	**1.7**	**1.8**	**1.9**	**1.11**	**1.12**	**1.13**	**1.15**	**xV5**	**BB**
1.1	0	72	39	-36	49	8	-14	-3	18	-14	35	28	-2
1.2	10	0	-60	-103	-46	-64	-76	-71	-69	-83	-74	44	-46
1.3	-49	-9	0	-111	-88	-78	281	-66	-57	-93	-115	-89	-33
1.5	61	106	77	0	13	28	17	20	40	2	-3	87	19
1.7	94	77	51	-25	0	-9	-3	12	4	-4	-17	96	17
1.8	42	71	74	-24	2	0	-9	1	-1	-12	-5	61	4
1.9	14	74	28	-24	6	4	0	3	5	-13	8	16	-17
1.11	59	66	77	-20	3	-5	13	0	11	-9	-5	92	21
1.12	84	67	61	-36	-12	-8	-6	-4	0	-16	-34	95	12
1.13	74	93	49	-12	22	12	23	21	19	0	20	98	55
1.15	127	90	51	-9	17	12	19	19	21	5	0	125	59
xV5	189	330	22	14	611	376	-17	113	445	44	750	0	100
BB	25	73	65	3	34	23	14	19	22	13	39	44	0
				I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**		**VIII**	
		Corte=100		1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.9	1.15		xV5	
								1.8					
								1.11					
								1.12					
								1.13					
				I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**		**IX**
		Corte= 90		1.1	1.2	1.3	1.5	1.7	1.8	1.9	1.15		xV5
							1.13		1.11				
									1.12				

Ejemplo 5: Análisis de inmunohistoquímica (IHC) de GPNMB

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra GPNMB se evaluaron para la reactividad con especímenes de tejidos congelados y fijados. Se cortaron secciones de tejido (5 µm) de muestras de tejido fijadas en formalina e incorporadas en parafina y se rehidrataron mediante incubaciones en xileno y una serie en etanol graduado terminando en PBS. La actividad de peroxidasa endógena se inactivó en una disolución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol.

Las secciones de tejido se bloquearon en tampón de bloqueo (BSA al 5% (Sigma), suero de cabra al 1% (Jackson Immunolabs, West Grove, PA) en PBS) durante 1 hora. Los anticuerpos primarios y secundarios se precomplejaron en BSA al 5% y suero de cabra al 1% en PBS durante 1 hora a 37ºC a una relación molar de aproximadamente 10:1 de anticuerpo dirigido contra GPNMB o IgG de control con respecto a anticuerpo de cabra

dirigido contra IgG humana biotinilada secundaria (Jackson Immunolabs). Los complejos se bloquearon con una dilución 1:2000 de suero humano y se incubaron de nuevo durante 1 hora a 37ºC. Las secciones de tejido se incubaron con anticuerpo dirigido contra GPNMB o complejos de anticuerpos de control de isotipo diluidos en tampón de bloqueo durante 1 hora. Las secciones se lavaron en 3 cambios de PBS durante 5 a 10 minutos cada uno y se incubaron con una dilución 1:200 de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (Jackson Immunolabs) en tampón de bloqueo durante 30 minutos y luego se lavaron como antes. El anticuerpo se detectó usando el reactivo DAB (Vector labs). Las secciones se contratiñeron en hematoxilina (Fisher Scientific) y se deshidrataron mediante alcohol y xileno y se cubrieron en el cubreobjetos con Permount (Fisher Scientific).

Los mAb dirigidos contra GPNMB 2.22.1 y 2.22.2 se usaron para teñir micromatrices de tejido humano normal y tumoral (IMPATH, Los Angeles, CA). La tinción positiva se observó en carcinomas de pulmón, ovario, renal, esófago y cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, melanomas y especímenes de piel normal. El melanoma y los carcinomas de pulmón mostraron las mayores intensidades de tinción con tinción subcelular localizada en la membrana y el citoplasma. El mAb dirigido contra GPNMB 2.10.2 también tiñó melanoma primario.

La tinción de anticuerpos dirigidos contra GPNMB de matrices de tejido de melanoma mostró una gran proporción de casos de melanoma que se tiñeron positivamente como se muestra en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10: Intensidad de tinción de melanoma de mAb dirigido contra GPNMB

Intensidad de tinción*	**Nº de muestras**	%
0	10	17
1	1	2
1-2	2	3
1-3	11	19
2	9	15
2-3	17	29
3	9	15
Total	n=59	100
En una escala de 0 (sin tinción) a 3 (tinción fuerte)		

Tabla 11: Frecuencia de tinción de mAb dirigido contra GPNMB

Reactividad tumoral en %*	**Nº de muestras**	%
0-24	18	31
25-49	6	10
50-74	7	12
75-100	28	47
	n=59	100%
*células tumorales en % que presentan tinción positiva		

El anticuerpo dirigido contra GPNMB tiñó 10 de 14 muestras de carcinoma de células escamosas de pulmón (SCC) en una micromatriz de tejido de oncología general y 24 de 60 en una matriz específica de SCC fueron positivos.

Ejemplo 6: Análisis por FACS de la unión de anticuerpos dirigidos contra GPNMB a líneas celulares de melanoma

La especificidad de anticuerpos dirigidos contra GPNMB por proteína GPNMB unida a la membrana celular expresada por la línea de células de cáncer de melanoma UACC-62 se analizó por análisis por FACS. Como control negativo se usó una línea de células cancerosas renales, TK10, que no expresaba antígeno de GPNMB. Como control negativo se usó el anticuerpo del mismo isotipo K16.3. Las células se lavaron dos veces con PBS (libre de Ca y Mg), se incubaron con Versene a 37ºC hasta que las células se desprendieron, se contaron y se tomaron alícuotas de 1 millón de células por tubo de ensayo. Entonces, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS frío en hielo (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, NaN3 al 0,1% y SBF al 4%). Se añadió anticuerpo primario a 1 µg/mL a las células. Las células se incubaron sobre hielo durante 30 min, se lavaron 2-3 veces y se resuspendieron en 1 ml de tampón FACS frío en hielo. Se añadió anticuerpo de cabra dirigido contra inmunoglobulina humana conjugado con R-PE (Jackson ImmunoResearch Laboratory) a dilución 1:100 y las células se incubaron sobre hielo durante 30 min. Después de lavar 3 veces con 1 ml de tampón FACS frío en hielo, las células se fijaron con 0,5-1 mL de formaldehído al 1% en PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados expresados como relaciones de medias geométricas se resumen en la Tabla 12 y muestran células UACC-62, pero no células TK10, que expresan altamente proteína CR011 sobre la superficie celular que se detectó por los anticuerpos 2.10.2; 2.22.1 y 1.15.1.

Tabla 12: Relación de medias geométricas de la tinción de anticuerpo

dirigido contra GPNMB (con respecto a pK16)

A. Anticuerpo	**B. Células UACC-62**	**C. Células TK10**
D. 2.10.2	E. 2,60	F. 1,10
G. 2.22.1	H. 4,46	I. 1,10
J. 1.2.2	K. 1,24	L. 0,98
M. 1.15.1	N. 7,89	O. 0,96
P. 2.6.2	Q. 1,90	R. 1,70

Para examinar la expresión relativa del antígeno GPNMB entre líneas celulares de melanoma se usó el anticuerpo mAb 1.15.1 para medir un panel de 15 líneas celulares de melanoma por análisis por FACS. Como se muestra en la Tabla 13, el 80% (12/15) de las líneas celulares mostraron expresión del antígeno GPNMB. La línea celular SK-MEL-2 demostró la mayor relación de medias geométricas entre las líneas celulares probadas.

Tabla 13: Relación de medias geométricas de tinción de anticuerpo dirigido contra GPNMB de líneas celulares de melanoma

Línea celular	Relación de medias geométricas
	(con respecto al isotipo)
SK-MEL-2	16,5
M14	16,1
MEWO	14,1
WM-266-4	13,6
HEMNLP	10,2
G361	8
HT144	7,4
UACC-257	7

RPMI-7951	6
SK-MEL-5	5,7
UACC-62	5,5
A2058	4,1
SK-MEL-24	1,9
WM115	1,3
LOXIMVI	1

Ejemplo 7: Análisis por FACS de unión de mAb dirigido contra GPNMB a linfoma y leucemia

Para determinar la expresión relativa de GPNMB sobre la superficie de células malignas hematopoyéticas, líneas celulares derivadas de diversos linfomas y leucemias se incubaron con anticuerpo dirigido contra GPNMB y se analizaron por FACS. Las células derivadas de linfoma o leucemia se lavaron dos veces con tampón FACS frío en hielo y se resuspendieron a 1 millón de células por tubo de ensayo. El anticuerpo mAb 1.15.1 a 1 µg/ml se añadió a las células y las células se incubaron sobre hielo durante 30 min. Entonces, las células se lavaron 2-3 veces y se resuspendieron en 1 ml de tampón FACS frío en hielo. Se añadió anticuerpo anti-humano de cabra conjugado con R-PE a 1:100 dilución y las células se incubaron sobre hielo durante 30 min. Las células se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón FACS frío en hielo, se fijaron con 0,5-1 ml de formaldehído al 1% en PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Aproximadamente la mitad de las líneas celulares examinadas, que se derivaron tanto de linajes mieloides como linfoides, mostraron expresión en la superficie celular de GPNMB (Tabla 14). La línea celular U937 demostró la mayor relación de medias geométricas entre las líneas celulares probadas.

Tabla 14: Relación de medias geométricas de tinción de anticuerpo dirigido contra GPNMB de células de linfoma y leucemia

Línea celular		Relación de medias geométricas
U937	(linfoma histiocítico, monocítico)	17,3
Jurkat	(leucemia aguda de células T)	14,7
SR	(linfoma de células T grandes anaplásicas, ALCL)	7,1
KG-1	(leucemia mielógena aguda)	6,9
MOLT-4	(leucemia linfoblástica aguda de células T)	6,2
THP-1	(leucemia monocítica aguda)	6,1
MV4-11	(leucemia mielomonocítica)	1,9
AML-193	(leucemia monocítica aguda)	1,8
HUT-78	(linfoma de células T)	1,5
CCRF-CEM	(leucemia linfoblástica aguda de células T)	10,9
Karpas 299	(ALCL)	10,7
SU-DHL-1	(ALCL)	4,8
SU-DHL-4	(linfoma de células B)	1,8
ML-2	(leucemia mielomonocítica aguda)	2,1
HH	(leucemia cutánea de células T)	1

SUP-M2	(ALCL)	4,8
PL-21	(leucemia mieloide aguda)	12
DEL	(ALCL)	7,9
SIG-M5	(leucemia monocítica aguda)	2,9
K562	(Leucemia mielógena crónica)	2,8
KG1a	(leucemia mielógena aguda)	2,7
HL-60	(leucemia promielocítica aguda)	2,3
WSU-NH2	(linfoma de células B)	1
EOL-1	(leucemia mieloide aguda)	1
HUT-102	(linfoma de células T)	1

Ejemplo 8: Detección de proteína GPNMB por IP y análisis de transferencia Western

Las células se lavaron dos veces con PBS (libre de Ca y Mg), se incubaron con Versene a 37ºC hasta que las células se desprendieron, se contaron y se lisaron en tampón de lisis (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,02 M, glicerina al 10%, NP-40 al 1%, EDTA 0,01 M) e inhibidores de proteasa que contenían extracto de páncreas, Pronase, termolisina, quimotripsina, y papaína (Roche, Alemania) durante 30 min sobre hielo. Los sobrenadantes se recogieron y las concentraciones de proteína se determinaron mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, EE.UU.). Se añadió anticuerpo primario a los lisados de células y se incubaron sobre hielo durante 3 h seguido de la adición de proteína-G agarosa (Amersham, EE.UU.) durante 2 h. Las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron, se hirvieron en tampón de muestra y se resolvieron mediante geles al 4-20%. Para la inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Invitrogen, EE.UU.) y se sondaron con anticuerpo dirigido contra GPNMB (0,5 µg/ml) seguido de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratory) a dilución 1:4000. Los inmunocomplejos se detectaron con reactivos de detección de transferencia de Western ECL (Amersham, USA).

El análisis de transferencia Western mostró que los anticuerpos dirigidos contra GPNMB inmunoprecipitaron la proteína GPNMB expresada en los lisados de células de las líneas celulares UACC-62, SK-MEL-5 y SK-MEL-2. Los resultados coinciden con la expresión de la superficie celular determinada por análisis por FACS.

Ejemplo 9: Destrucción indirecta de células mediada por anticuerpos dirigidos contra GPNMB

UACC-62, una línea celular que expresa el antígeno de GPNMB, y TK10, una línea celular que no expresa, se sembraron sobre placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) a una densidad de 3000 células por pocillo. Una vez las células alcanzaron el ~25% de confluencia, se añadieron 100 ng/pocillo de conjugado de anticuerpo secundario-toxina (anticuerpo de cabra dirigido contra IgG-saporina; Advanced Targeting Systems, San Diego, EE.UU., HUM-ZAP; nº de cat. IT-22). Se añadieron los mAb dirigidos contra GPNMB 2.10.2, 2.22.1, 1.15.1 o el mAb de control de isotipo (PK16.3) a cada pocillo a una concentración final de 10 ó 50 ng/ml. Se usó un anticuerpo monoclonal dirigido contra EGFR (MS-269-PABX, NeoMarkers, Fremont, CA, EE.UU.) como control de anticuerpo primario positivo. Se usó el reactivo de quimioterapia 5-FU a 600 uM como control de reactivo positivo. En el día 5, las células se tripsinaron, se transfirieron a placas de cultivo de tejido de 6 pocillos y se incubaron a 37ºC. Las placas se examinaron diariamente y entre 8-10 días, todas las placas se tiñeron con Giemsa y las colonias se contaron.

La viabilidad en porcentaje de UACC-62 positiva para GPNMB después del tratamiento se muestra en la Figura 2. El reactivo de quimioterapia 5-FU indujo una destrucción completa, mientras que la adición del anticuerpo secundario conjugado con la toxina saporina solo o en combinación con el anticuerpo PK16.3 de control de isotipo no tuvo efecto sobre el crecimiento celular para ambas líneas celulares. Ambas líneas celulares UACC-62 y TK10 expresan la proteína EGFR y la adición de anticuerpo específico de EGFR a 50 ng/mL y el conjugado de anticuerpo secundario-toxina produjeron una destrucción completa de las células UACC-62 y TK10. A la misma dosis, los tres anticuerpos específicos GPNMB, 2.10.2, 2.22.1 y 1.15.1, indujeron más del 70% de la destrucción de células UACC-62. Los anticuerpos dirigidos contra GPNMB 2.10.2 y 2.22.1 indujeron menos del 5% y 1.15.1 menos del 24% de muerte celular en células TK10 negativas para GPNMB.

Ejemplo 10: Destrucción de células por anticuerpos dirigidos contra GPNMB conjugados con auristatina E (AE)

Las células UACC-62 y TK10 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). En el día 2 o cuando las células alcanzan el ~25% de confluencia, a las células se añadieron diversas concentraciones (1 a 1000 ng/mL) de anticuerpos sin conjugar y conjugados con auristatina E (Seattle Genetics, Bothell, WA, EE.UU.), incluyendo control de isotipo, EGFR (NeoMarkers MS-269-PABX, Fremont, CA, EE.UU.), 2.22.1 ó 2.10.2. Se eligió el mAb 2.3.1 para el control de isotipo en este estudio debido a que no se une a células que expresan GPNMB como se demuestra por análisis por FACS. Se usó un anticuerpo monoclonal generado contra el receptor de EGF para demostrar la destrucción específica mediada por anticuerpo conjugado con AE. En el día 5, las células se tripsinaron, se transfirieron a placas de cultivo de tejido de 6 pocillos y se incubaron a 37ºC. Las placas se examinaron diariamente. En los días 8-10, todas las placas se tiñeron con Giemsa y se contaron las colonias sobre las placas.

La viabilidad en porcentaje en las células UACC-62 positivas y las células TK10 negativas para GPNMB se presenta en la Figura 3. Los resultados indican que el inmunoconjugado 2.6.2 sin conjugar y conjugado con AE no tuvieron efecto sobre el crecimiento de tanto células UACC-62 como TK10. Sin embargo, tanto las líneas celulares UACC-62 como TK10 fueron susceptibles a la destrucción de células mediada por el inmunoconjugado AE-EGFR en un modo dependiente de la dosis con más del 95% de muerte celular a 1000 ng/ml. A la misma dosis, tanto los inmunoconjugados 2.22.1-AE como 2.10.2-AE indujeron aproximadamente el 75% de muerte celular de células UACC-62 cuando se comparó con el control de isotipo. La respuesta a la destrucción celular fue dependiente de la dosis. La supervivencia de células TK10 negativas para GPNMB no se afectó por los inmunoconjugados 2.22.1-AE ni 2.10.2-AE al mismo intervalo de dosis. Estos resultados demuestran los efectos específicos y citotóxicos de anticuerpos dirigidos contra GPNMB conjugados con AE sobre las células que expresan antígeno.

Ejemplo 11: Células de melanoma susceptibles a la destrucción por el inmunoconjugado mAb 1.15.1-AE

Se sembraron líneas celulares de melanoma en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). En el día 2 o cuando las células alcanzan el ~25% de confluencia, a las células se añadieron diversas concentraciones de 1.15.1 sin conjugar y conjugado con auristatina E. En este estudio también se usó mAb 2.6.2-AE como un control de isotipo conjugado. En el día 5, las células se tripsinaron, se transfirieron a placas de cultivo de tejido de 6 pocillos y se incubaron a 37ºC. Las placas se examinaron diariamente. En los días 8-10, todas las placas se tiñeron con Giemsa y se contaron las colonias sobre las placas.

La CI_{50} de la destrucción mediada por 1.15.1-AE sobre las células positivas y negativas para GPNMB se presenta en la Tabla 15. 1.15.1 sin conjugar y 2.6.2 conjugado con AE no tuvieron efecto sobre el crecimiento de todas las líneas celulares de melanoma probadas. Sin embargo, las líneas celulares SK-MEL-2, WM-266-4, G361, UACC-257, UACC-62, RPMI-7951 y SK-MEL-5 fueron susceptibles a la destrucción mediada por 1.15.1-AE en un modo dependiente de la dosis. SK-MEL-2 demostró la CI50 más baja en este estudio (Tabla 15). Estos resultados muestran los efectos específicos y citotóxicos de 1.15.1 conjugado con AE sobre la mayoría de las células de melanoma que expresan GPNMB.

Tabla 15: Relación de medias geométricas y valores de CI50 de la destrucción por 1.15.1-AE de células de melanoma

Melanoma	**Relación de medias geométricas**		**Ensayo clonogénico con 1.15.1-AE**	
Línea celular	**(con respecto al isotipo)**		**CI50 en ng/ml (pM)**	
SK-MEL-2	16,5		111	(750)
M14	16,1		Inconcluyente	
MEWO	14,1		Inconcluyente	
WM-266-4	13,6		345	(2300)
HEMNLP	10,2		Inconcluyente	
G361	8		1053	(6500)
HT144	7,4		Inconcluyente	

UACC-257	7		825	(5500)
RPMI-7951	6		972	(6000)
SK-MEL-5	5,7		237	(1600)
UACC-62	5,5		697	(4300)
A2058	4,1		Sin efecto	
SK-MEL-24	1,9		Sin datos	
WM115	1,3		Sin datos	
LOXIMVI	1		Sin efecto	

Ejemplo 12: Destrucción por mAb 1.15.1-AE de líneas celulares de linfoma y leucemia

Se mezclaron líneas celulares de linfoma o leucemia con medio base de metilcelulosa (R&D Systems, EE.UU.) y en diversas concentraciones de anticuerpo 1.15.1 sin conjugar y conjugado con auristatina E antes de sembrar en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). También se incluyó mAb 2.6.2-AE como control de isotipo conjugado en este estudio debido a que no se une a células que expresan GPNMB. Las placas se incubaron a 37ºC y se examinaron diariamente. En los días 14-18 las colonias se contaron sobre las placas.

La CI_{50} de la destrucción celular inducida por 1.15.1-AE sobre las células que expresan antígeno se presenta en la Tabla 16. 1.15.1 sin conjugar y el inmunoconjugado de 2.6.2 conjugado con AE no tuvieron efecto sobre crecimiento de todas las líneas celulares hematopoyéticas positivas para antígeno. Sin embargo, como se presenta en la Tabla 16, las líneas celulares U937, SR y THP-1 derivadas de o bien linaje mieloide o linfoide fueron susceptibles a la destrucción mediada por 1.15.1-AE de un modo dependiente de la dosis con valores de CI50 que oscilaban de 207 ng/ml (1,4 nM) a 340 ng/ml (2,4 nM). Estos resultados muestran los efectos específicos y citotóxicos del inmunoconjugado 1.15.1-AE sobre las líneas celulares malignas hematopoyéticas que expresan el antígeno de GPNMB.

Tabla 16: Relaciones de medias geométricas y valores de CI50 de la destrucción por 1.15.1-AE de células de linfoma y leucemia

			Ensayo clonogénico con 1.15.1-AE	
Línea celular		Relación de medias geométricas	CI50 en ng/mL	(pM)
U937	(linfoma histiocítico, monocítico)	17,3	340	(2400)
Jurkat	(leucemia aguda de células T)	14,7	Sin efecto	(repetición)
SR	(linfoma de células T grandes anaplásicas, ALCL)	7,1	296	(2000)
KG-1	(leucemia mielógena aguda)	6,9	Sin crecimiento	
MOLT-4	(leucemia linfoblástica aguda de células T)	6,2	Sin efecto	(repetición)
THP-1	(leucemia monocítica aguda)	6,1	207	(1400)
MV4-11	(leucemia mielomonocítica)	1,9	ND	
AML-193	(leucemia monocítica aguda)	1,8	ND	
HUT-78	(linfoma de células T)	1,5	ND	

CCRF-CEM	(leucemia linfoblástica aguda de células T)	10,9	Sin crecimiento
Karpas 299	(ALCL)	10,7	Inconcluyente
SU-DHL-1	(ALCL)	4,8	Sin efecto
SU-DHL-4	(linfoma de células B)	1,8	ND
ML-2	(leucemia mielomonocítica aguda)	2,1	ND
HH	(leucemia cutánea de células T)	1	ND
SUP-M2	(ALCL)	4,8	Sin crecimiento
PL-21	(leucemia mieloide aguda)	12	Sin efecto
DEL	(ALCL)	7,9	Sin efecto
SIG-M5	(leucemia monocítica aguda)	2,9	ND
K562	(leucemia mielógena crónica)	2,8	ND
KG1a	(leucemia mielógena aguda)	2,7	ND
HL-60	(leucemia promielocítica aguda)	2,3	ND
WSU-NH2	(linfoma de células B)	1	ND
EOL-1	(leucemia mieloide aguda)	1	ND
HUT-102	(linfoma de células T)	1	ND
* ND: sin hacer			

Ejemplo 13: CR011-vcMMAE inhibe el crecimiento de xenoinjertos de melanoma SK-MEL-2 humano conduciendo a la regresión completa de tumor de melanoma establecido en ratones atímicos (estudio N-386)

El estudio N-386 se realizó para evaluar la potencia y la eficacia terapéutica del conjugado anticuerpo-fármaco, CR011-vcMMAE, contra el xenoinjerto de melanoma SK-MEL-2 humano establecido en ratones atímicos.

Materiales y procedimientos:

Animales experimentales: Se obtuvieron ratones atímicos de cinco a 6 semanas de edad (hembras CD-1 nu/nu) usadas para xenoinjertos de tumores humanos de Harlan Laboratories (Indianápolis, IN). Los animales se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos según las pautas de la Asociación internacional para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio (AAALAC International). A los animales experimentales se les proporcionó alimento granulado y agua a voluntad y se mantuvieron en una habitación con ventilación acondicionada (HVAC), temperatura (22º ± 2ºC), humedad relativa (55% ± 15%) y fotoperiodo (12 h). Todos los estudios se llevaron a cabo con protocolos de cuidado y uso de animales institucionales aprobados.

Modelos de xenoinjerto de melanoma humano. La actividad inhibitoria tumoral del inmunoconjugado CR011-MMAE se midió en un modelo de xenoinjerto anti-tumoral usando ratones atímicos según procedimientos publicados (véase Geran y col., Cancer Chemother. Rep. 3:1-104 (1972)). Brevemente, a los animales experimentales se les implantó subcutáneamente mediante trocar pequeños fragmentos de un melanoma humano (60-125 mg) extirpado de donantes de tumor de ratón atímico. Cuando los tumores se establecieron (10-20 días), los animales formaron parejas en grupos (n= 6 ratones/grupo) y el tratamiento se administró por inyección intravenosa (vena de la cola).

El melanoma humano SK-MEL-2 (nº ATCC HTB-68) se derivó de un sitio metastásico (piel del muslo) de un

varón caucásico de 60 años de edad con melanoma maligno, y el melanoma humano SK-MEL-5 (nº ATCC HTB-70) se derivó de un sitio metastásico (ganglio linfático axilar) de una hembra de 24 años de edad con melanoma maligno (véase Fogh y col., J. Natl. Cancer Inst. 59: 221-226 (1977)). Ambas líneas celulares se obtuvieron de la Colección americana de cultivos tipo.

Los efectos del tratamiento se monitorizaron mediante mediciones repetidas del tumor a través de 2 diámetros con compases calibradores de Vernier; el tamaño del tumor (en mg) se calculó usando una fórmula estándar, $(W^2 \times L)/2$, asumiendo una gravedad específica de 1,0. El tamaño del tumor y los pesos corporales se evaluaron dos veces a la semana. Los ratones se examinaron diariamente, sin embargo, los animales moribundos se sacrificaron humanitariamente si se observaban indicaciones clínicas de dolor excesivo o molestia (es decir, postración, postura encorvada, parálisis/paresis, abdomen distendido, úlceras, abscesos, convulsiones y/o hemorragias). Los animales con tumores que superaban 2.000 mg se sacaron del estudio y se sacrificaron humanitariamente.

Se ha mostrado que los estudios de xenoinjerto en el ratón atímico demuestran eficazmente efectos antitumorales para una variedad de agentes que han mostrado posteriormente que tienen actividad contra cáncer clínico (Johnson y col., Br J Cancer 84:1424-1431 (2001)).

Resultados:

Efectos antitumorales in vivo frente a melanoma SK-MEL-2. Basándose en la potencia y la citotoxicidad de CR011-vcMMAE frente a células que expresan GPNMB in vitro, los efectos antitumorales se examinaron in vivo.

Los efectos del tratamiento intravenoso con CR011-vcMMAE sobre el crecimiento de melanoma SK-MEL-2 humano subcutáneo se muestran en la Figura 1. Después de implantar fragmentos del tumor SK-MEL-2 y de que los tumores se hubieran establecido (día 17, 61 mg), el tratamiento comenzó con la administración intravenosa de: CR011-vcMMAE (0,625 - 20 mg/kg i.v., cada 4 días durante un total de 4 tratamientos (es decir, q4d X4); controles de solución salina y solución salina tamponada con fosfato (i.v., q4d X4); y dos agentes de referencia antitumoral conocidos, sulfato de vinblastina (i.v., 1.7 mg/kg, q4d X4) y paclitaxel (i.v., 24 mg/kg, q2d X4). Los agentes de referencia se administraron a la dosis máxima tolerada (DMT) determinada en estudios previos.

Los tumores en animales tratados con solución salina o PBS crecieron progresivamente hasta que la masa tumoral alcanzó 2.000 mg, momento en el que los animales se sacaron del estudio y se sacrificaron humanitariamente. Los tumores SK-MEL-2 tenían una alta tasa de “aceptación” en huéspedes inmunodeprimidos (97 %) y una baja tasa de regresión espontánea (3%) (Dykes y col., Development of human tumor xenograft models for in vivo evaluation of new antitumor drugs, en Immunodeficient mice in Oncology, vol. 42 (Fiebig HH y Berger DPe eds), pág. 1-22, Contrib. Oncol. Basel, Karger (1992)).

La vinblastina produjo un efecto antitumoral muy ligero, pero no significativo ($P \leq 0,20$); en este y otros modelos de tumor (por ejemplo, SK-MEL-5) la vinblastina produce una inhibición perceptible del crecimiento tumoral, pero que sólo es ocasionalmente significativa. Sin embargo, el paclitaxel mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral y la estasis tumoral (es decir, 100% de la inhibición del crecimiento) durante aproximadamente 2 semanas después de comenzado el tratamiento ($P \leq 0,0077$).

Los efectos antitumorales de CR011-vcMMAE administrado i.v. a ratones que tenían SK-MEL-2 fueron notables. A 20, 10, 5 ó 2,5 mg/kg, los tumores disminuyeron rápidamente en tamaño para la mayoría de los animales experimentales; se observaron efectos de tratamiento significativos ya 4 días después de comenzado el tratamiento ($P \leq 0,014$). Los tumores que experimentaron un retroceso completo no volvieron a crecer durante el periodo de observación (> 200 días).

Los animales en este estudio no mostraron efectos anormales del tratamiento en el examen macroscópico. Las determinaciones del peso corporal dos veces a la semana no mostraron efectos ni observables ni estadísticamente significativos del tratamiento con CR011-vcMMAE sobre el peso corporal o el aumento de peso.

Conclusiones:

CR011-vcMMAE produce efectos antitumorales sustanciales, dependientes de la dosis y reproducibles que empiezan como inhibición del crecimiento tumoral, pero que pronto conducen a la regresión completa de los xenoinjertos de melanoma humano establecidos; las regresiones son de larga duración y no se ha observado recrecimiento de tumores después de la terapia satisfactoria.

Ejemplo 14: Secuenciación de anticuerpos y su ADN correspondiente

Se obtuvieron secuencias de transcritos de cadena pesada y kappa derivados de mAb dirigidos contra GPNMB humanos a partir de hibridomas mediante secuenciación directa de productos de PCR generados a partir de poli(A^+) ARN. Los productos de PCR también se clonaron en pCRII usando un kit de clonación TA (Invitrogen) y ambas cadenas se secuenciaron usando los kits de secuenciación con terminador de colorante Prism y un instrumento de secuenciación ABI 377. Cada reacción de PCR usó una mezcla de cebadores sentido en 5' que se proporciona en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17: Cebadores usados

VH	cacc ATG GAC TGG(C) ACC TGG AGG ATC	SEQ ID NO: 290
VH	cacc ATG GAC TGG ACC TGG AGA(C) ATC	SEQ ID NO: 291
VH	cacc ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC	SEQ ID NO: 292
VH	cacc ATG GAC TGG ATT TGG AGG ATC	SEQ ID NO: 293
VH	cacc ATG GAC ACA CTT TGC TC(A)C AC	SEQ ID NO: 294
VH	cacc ATG GAA(G) TTG GGG CTG AGC TGG	SEQ ID NO: 295
VH	cacc ATG GAG TTG(T) GGA CTG AGC TGG	SEQ ID NO: 296
VH	cacc ATG GAG TTT GGG CTG(T) AGC TGG	SEQ ID NO: 297
VH	cacc ATG GAA CTG GGG CTC CGC TGG	SEQ ID NO: 298
VH	cacc ATG GAG TTG GGG CTG TGC TGG	SEQ ID NO: 299
VH	cacc ATG GAG TTT TGG CTG AGC TGG	SEQ ID NO: 300
VH	cacc ATG ACG GAG TTT GGG CTG AGC	SEQ ID NO: 301
VH	cacc ATG AAA(G) CAC CTG TGG TTC TTC	SEQ ID NO: 302
VH	cacc ATG AAA CAT CTG TGG TTC TTC	SEQ ID NO: 303
VH	cacc ATG GGG TCA ACC GCC ATC CTC	SEQ ID NO: 304
VH	cacc ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC TTC	SEQ ID NO: 305
VK	ATG GGG TCC CAG GTT CAC CTC	SEQ ID NO: 306
VK	ATG TTG CCA TCA CAA CTC ATT G	SEQ ID NO: 307

Todas las secuencias se analizaron mediante alineamientos con el “directorio de secuencias V BASE” (Tomlinson y col., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, RU) usando los programas de software MACVECTOR® y GENEWORKS™.

Ejemplo 15: Análisis estructural de anticuerpos dirigidos contra GPNMB

Las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables para los anticuerpos mostrados en la Tabla 17 se secuenciaron para determinar sus secuencias de ADN y de proteínas.

Anticuerpo -1.10.2

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5'AGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CTGGTGACTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG
TATTTCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTC
CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATA
GGGGCTGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:1)

Secuencia de aminoácidos

5'QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GDSISNYYWS WIRQPPGKGLEWIG YFYYSGSTNYNPSLKS
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR DRGWADY WGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID NO:2)

TABLA 18. Dominios de la región V de la cadena pesada de 1.10.2.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID NO:
FRI	QVQLQESGPGLVKPCONJUNTOLSLTCTVS	1-25	SEQ ID NO:3
CDR1	GDSISNYYWS	26-35	SEQ ID NO:4
FR2	WIRQPPGKGLEWIG	36-49	SEQ ID NO:5
CDR2	YFYYSGSTNYNPSLKS	50-65	SEQ ID NO:6
FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	66-97	SEQ ID NO:7
CDR3	DRGWADY	98-104	SEQ ID NO:8
FR4	WGQGTLVTVSSA	105-116	SEQ ID NO:9
*Residuos de AA de SEQ ID NO:2			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGGCCACCCTCT
CCTGCAGAACCAGTCAGAGTATTAGCAGCAGCTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA
GGTTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCTTCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTATTGTCAGCAGTATGGTAGCTCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACG
A 3' (SEQ ID NO:10)

Secuencia de aminoácidos

5'EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RTSQSISSSYLA WYQQKPGQVPRLLIY GASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSIT FGQGTRLEIKR 3' (SEQ ID NO:11)

TABLA 19. Dominios de la región V de la cadena ligera de 1.10.2.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	1-23	SEQ ID NO:12
CDR1	RTSQSISSSILA	24-35	SEQ ID NO:13
FR2	WYQQKPGQVPRLLIY	36-50	SEQ ID NO:14
CDR2	GASSRAT	51-57	SEQ ID NO:15
FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	58-89	SEQ ID NO:16
CDR3	QQYGSSIT	90-97	SEQ ID NO:17
FR4	FGQGTRLEIKR	98-108	SEQ ID NO:18
*Residuos de AA de SEQ ID NO:11			

Anticuerpo -1.15.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
TCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCACCACCCAGGGAAGGGCCT
GGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACC
ATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCG
TGTATTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:19)

Secuencia de aminoácidos

5'QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSPNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSGSTYSNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID NO:20)

TABLA 20. Dominios de la región V de la cadena pesada de 1.15.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS	1-30	SEQ ID NO:21
CDR1	SFNYYWS	31-37	SEQ ID NO:22
FR2	WIRHHPGKGLEWJG	38-51	SEQ ID NO:23
CDR2	YIYYSGSTYSNPSLKS	52-67	SEQ ID NO:24
FR3	RVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCAR	68-99	SEQ ID NO:25
CDR3	GYNWNYFDY	100-108	SEQ ID NO:26
FR4	WGQGTLVTVSSA	109-120	SEQ ID NO:27
*Residuos de AA de SEQ ID NO:20			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTGACAACAACTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAG
TTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT
GGCCTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:28)

Secuencia de aminoácidos

5'EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT
LTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:29)

TABLA 21. Dominios de la región V de la cadena ligera de 1.15.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUO DE AA*	SEQ ID
FRI	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	1-23	SEQ ID NO:30
CDR1	RASQSVDNNLV	24-34	SEQ ID NO:31
FR2	WYQQKPGQAPRLLIY	35-49	SEQ ID NO:32
CDR2	GASTRAT	50-56	SEQ ID NO:33
FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	57-88	SEQ ID NO:34
CDR3	QQYNNWPPWT	89-98	SEQ ID NO:35
FR4	FGQGTKVEIKR	99-109	SEQ ID NO:36
*Residuos de AA de SEQ ID NO:29			

Anticuerpo -1.2.2

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' ATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACC
TGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCGCTGGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAG
CCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATTTATTGGAATGATGATAAGCGCTAC
AGCCCATCTCTGAGGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTC
CTTACAATTACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTATTGTGCACACAGTCAC
TATGATTACGATTGGGGGAGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:37)

Secuencia de aminoácidos

5'ITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS GFSLSAGGVGVG WIRQPPGKALEWLA LIYWNDDKRY
SPSLRS RLTITKDTSKNQVVLTITNMDPVDTATYYCAH SHYDYDWGSYFDY WGQGTLVTVSSA 3'
(SEQ ID NO:38)

TABLA 22. Dominios de la región V de la cadena pesada de1.2.2.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	ITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS	1-24	SEQ ID NO:39
CDR1	GFSLSAGGVGVG	25-36	SEQ ID NO:40
FR2	WIRQPPGKALEWLA	37-50	SEQ ID NO:41
CDR2	LIYWNDDKRYSPSLRS	51-66	SEQ ID NO:42
FR3	RLTITKDTSKNQVVLTITNMDPVDTATYYCAH	67-98	SEQ ID NO:43
CDR3	SHYDYDWGSYFDY	99-111	SEQ ID NO:44
FR4	WGQGTLVTVSSA	112-123	SEQ ID NO:45
*Residuos de AA de SEQ ID NO:38			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5' GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGAC
TGGTACCTGCAGAAGCCAGGACAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGCTTTCCTATCGG
GCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAC
ATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTATAGAGTTT
CCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGA 3' (SEQ ID NO:46)

Secuencia de aminoácidos

5' DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLDSDDGNTYLD WYLQKPGQSPQLLIY TLSYRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDVGVYYC MQRIEFPIT FGQGTRLEIKR 3' (SEQ ID NO:47)

TABLA 23. Dominios de la región V de la cadena ligera de 1.2.2.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC	1-23	SEQ ID NO:48
CDR1	RSSQSLLDSDDGNTILD	24-40	SEQ ID NO:49
FR2	WILQKPGQSPQLLIY	41-55	SEQ ID NO:50
CDR2	TLSYRAS	56-62	SEQ ID NO:51
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDVGVYYC	63-94	SEQ ID NO:52
CDR3	MQRIEFPIT	95-103	SEQ ID NO:53
FR4	FGQGTRLEIKR	104-114	SEQ ID NO:54
*Residuos de AA de SEQ ID NO:47			

Anticuerpo -1.7.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGCTAATTACTACTGGACCTGGATCCGC

CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TGCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTATCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGG
TATAACTGGAACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:55)

Secuencia de aminoácidos

5' QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS GGSISSANYYWT WIRQHPGKGLEWIG YIYYSGSTY
CNPSLKS RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR GYNWNYFDY WGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID NO:56)

TABLA 24. Dominios de la región V de la cadena pesada de 1.7.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTV	1-25	SEQ ID NO:57
CDR1	GGSISSANYYWT	26-37	SEQ ID NO:58
FR2	WIRQHPGKGLEWIG	38-51	SEQ ID NO:59
CDR2	YIYYSGSTYCNPSLKS	52-67	SEQ ID NO:60
FR3	RVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	68-99	SEQ ID NO:61
CDR3	GYNWNYFDY	100-108	SEQ ID NO:62
FR4	WGQGTLVTVSSA	109-120	SEQ ID NO:63
*Residuos de AA de SEQ ID NO:56			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GATATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGGAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGACTCCTCATCTA
TGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAAGTGGCCTCCGTGGACG
TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCGAACGAACT 3' (SEQ ID NO:64)

Secuencia de aminoácidos

5'DIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVSSNLA WYQERPGQAPRLLIY GASTRAT
GIPARFSGSGSGTEPTLTISSLQSEDFAVYYC QQYNKWPPWT FGQGTKVEIER 3' (SEQ ID NO:65)

TABLA 25. Dominios de la región V de la cadena ligera de 1.7.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	1-23	SEQ ID NO:66
CDR1	RASQSVSSNLA	24-34	SEQ ID NO:67
FR2	WYQERPGQAPRLLIY	35-49	SEQ ID NO:68
CDR2	GASTRAT	50-56	SEQ ID NO:69
FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	57-88	SEQ ID NO:70
CDR3	QQYNKWPPWT	89-98	SEQ ID NO:71
FR4	FGQGTKVEIER	99-109	SEQ ID NO:72
*Residuos de AA de SEQ ID NO:65			

Anticuerpo -2.10.2

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC
AAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAATAATAAATACTATGCAGAC
TCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTAGTGGTT

CGGGGAATTAGGGGGTACTACTACTACTTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:73)

Secuencia de aminoácidos

5' QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFAFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISYDGNNKYYAD
SVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DLVVRGIRGYYYYFGMDV WGQGTT
VTVSSA 3' (SEQ ID NO:74)

TABLA 26. 2.10.2 Dominios de la región V de la cadena pesada.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	1-23	SEQ ID NO:75
CDR1	GFAFSSYGMH	24-33	SEQ ID NO:76
FR2	WVRQAPGKGLEWVA	34-47	SEQ ID NO:77
CDR2	VISYDGNNKYYADSVKG	48-64	SEQ ID NO:78
FR3	RFT1SRDNSKNTLILQMNSLRAEDTAVYYCAR	65-96	SEQ ID NO:79
CDR3	DLVVRGRGYYYYFGMDV	97-114	SEQ ID NO:80
FR4	WGQGTTVTVSSA	115-126	SEQ ID NO:81
*Residuos de AA de SEQ ID NO:74			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5' GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTCTACAAACTCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGA 3' (SEQ ID NO:82)

Secuencia de aminoácidos

5' DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLHSNGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIY LGSNRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGLQTPIT FGQGTRLEIKR 3'(SEQ ID NO:83)

TABLA 27. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.10.2.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUO DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	1-23	SEQ ID NO:84
CDR1	RSSQSLLHSNGINILD	24-39	SEQ ID NO:85
FR2	WILQKPGQSPQLLIY	40-54	SEQ ID NO:86
CDR2	LGSNRAS	55-61	SEQ ID NO:87
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	62-93	SEQ ID NO:88
CDR3	MQGLQTPIT	94-102	SEQ ID NO:89
FR4	FGQGTRLEIKR	103-113	SEQ ID NO:90
*Residuos de AA de SEQ ID NO:83			

Anticuerpo - 2.15.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATTCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGACGTAATAAATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACGCGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCC
TTTGACTATGGTGACTCCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGCC 3' (SEQ ID NO:91)

Secuencia de aminoácidos

5' QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSNYGIH WVRQAPGKGLEWVA VIWFDGRNKYY
ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAR DPFDYGDSFFDY WGQGTLVTVSSA 3'
(SEQ ID NO:92)

TABLA 28. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.15.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	1-25	SEQ ID NO:93
CDR1	GFTFSNYGIH	26-35	SEQ ID NO:94
FR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	SEQ ID NO:95
CDR2	VIWFDGRNKYYADSVKG	50-66	SEQ ID NO:96
FR3	RFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDAAVYYCAR	67-98	SEQ ID NO:97
CDR3	DPFDYGDSFFDY	99-110	SEQ ID NO:98
FR4	WGQGTLVTVSSA	111-122	SEQ ID NO:99
*Residuos de AA de SEQ ID NO:92			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

55' CTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAAGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTT
CCTAATCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTT
GCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGCCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG
GTGGAGATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:100)

Secuencia de aminoácidos

5' LTQSPSSLSASVRDRVTITC RASQDISNYLA WYQQKPGKVPNLLIY AASTLQS GVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QKYNSAPLT FGGGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:101)

TABLA 29. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.15.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	LTQSPSSLSASVRDRVTITC	1-20	SEQ ID NO:102
CDR1	RASQDISNILA	21-31	SEQ ID NO:103
FR2	WYQQKPGKVPNLLIY	32-46	SEQ ID NO:104
CDR2	AASTLQ	47-52	SEQ ID NO:105
FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	53-84	SEQ ID NO:106
CDR3	QKYNSAPLT	85-93	SEQ ID NO:107
FR4	FGGGTKVEIKR	94-104	SEQ ID NO:108
*Residuos de AA de SEQ ID NO:101			

Anticuerpo -2.16.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGACCTGGATCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTATTAGTGGTAGTATCACACACTAC
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATGTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACGGA
GCAGCAGCTGGTACGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCACGGGACAAAGGTCACCGTCTCT
TCAGCC 3' (SEQ ID NO:109)

Secuencia de aminoácidos

5' QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYYMT WIRQAPGKGLEWVS YISISGSITHY

ADSVKG RFTMSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DGAAAGTDAFDI WGHGTKVTVSSA 3'
(SEQ ID NO:110)

TABLA 30. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.16.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	1-25	SEQ ID NO:111 I
CDR1	GFTFSOYYMT	26-35	SEQ ID NO:112
FR2	WIRQAPGKGLEWVS	36-49	SEQ ID NO:13
CDR2	YISISGSITHYADSVKG	50-66	SEQ ID NO:114
FR3	RFTMSRADNKNSLILQMNSLRAEDTAVYYCAR	67-98	SEQ ID NO:115
CDR3	DGAAAGTDAFDI	99-110	SEQ ID NO:116
FR4	WGHGTKVTVSSA	111-122	SEQ ID NO:117
*Residuos de AA de SEQ ID NO:110			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GAGATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTATCTGTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAATGTTAGCAGCAACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTT
TGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTACAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATCATTACTGGCCCACTTTCGGC
CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:118)

Secuencia de aminoácidos

5'EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSC RASQNVSSNLA WYQQKPGQAPRLLIF GASTRAT
GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYHYWPT FGPGTKVDIKR 3' (SEQ ID NO:119)

TABLA 31. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.16.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSC	1-23	SEQ ID NO:120
CDR1	RASQNVSSNLA	24-34	SEQ ID NO:121
FR2	WYQQKPGQAPRLLIF	35-49	SEQ ID NO:122
CDR2	GASTRAT	50-56	SEQ ID NO:123
FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	57-88	SEQ ID NO:124
CDR3	QQYHYWPT	89-96	SEQ ID NO:125
FR4	FGPGTKVDIKR	97-107	SEQ ID NO:126
*Residuos de AA de SEQ ID NO:119			

Anticuerpo -2.17.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC
AAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTTCTATATGCACTGGGTGCGACAGACCCCTGGA
CAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACATATTATGTACAG
AAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGTCTACATGGAG
CTGAGCAGGTTGAGATCTGACGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGATGGGTATAGC
AGTGGAGAGGACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:127)

Secuencia de aminoácidos

5' QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGFYMH WVRQTPGQGLEWMG WINPNSGGTYYVQ
KFQG RVTMTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCAR DGYSSGEDWFDP WGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID NO:128)

TABLA 32. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.17.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	1-23	SEQ ID NO:129
CDR1	GYTFTGFYMH	24-33	SEQ ID NO:130
FR2	WVRQTPGQGLEWMG	34-47	SEQ ID NO:131
CDR2	WINPNSGGTYYVQKFQG	48-64	SEQ ID NO:132
FR3	RVTMTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCAR	65-96	SEQ ID NO:133
CDR3	DGYSSGEDWFDP	97-108	SEQ ID NO:134
FR4	WGQGTLVTVSSA	109-120	SEQ ID NO:135
*Residuos de AA de SEQ ID NO:128			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAG
TCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGGTGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC
ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGA
CAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAC
CTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:136)

Secuencia de aminoácidos

5'DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHSGGKTYLY WYLQRPGQPPQLLIY EVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSIHLPLT FGGGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:137)

TABLA 33. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.17.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	1-23	SEQ ID NO:138
CDR1	KSSQSLLHSGGKTILY	24-39	SEQ ID NO:139
FR2	WILQRPGQPPQLLIY	40-54	SEQ ID NO:40
CDR2	EVSNRFS	55-61	SEQ ID NO:141
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	62-93	SEQ ID NO:142
CDR3	MQSIHLPLT	94-102	SEQ ID NO:143
FR4	FGGGTKVEIKR	103-113	SEQ ID NO:144
*Residuos de AA de SEQ ID NO:137			

Anticuerpo -2.21.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGATTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTCATTAGTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAC
TGGGTGGGAGCTACCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:145)

Secuencia de aminoácidos

5' QVQLEQSGGGLVKPGGSLRFSCAAS GFTFSSYSMN WVRQAPGKGLEWVS FISSSSSYIYY ADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EDWVGATFDY WGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID NO:146)

TABLA 34. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.21.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLEQSGGGLVKPGGSLRFSCAAS	1-25	SEQ ID NO:147
CDR1	GFTFSSYSMN	26-35	SEQ ID NO:148
FR2	WVRQAPGKGLEWVS	36-49	SEQ ID NO:149
CDR2	FISSSSSYIYYADSVKG	50-66	SEQ ID NO:150
FR3	RFTISRADNKNSLILQMNSLRAEDTAVYYCAR	67-98	SEQ ID NO:151
CDR3	EDWVGATFDY	99-108	SEQ ID NO:152
FR4	WGQGTLVTVSSA	109-120	SEQ ID NO:153
*Residuos de AA de SEQ ID NO:146			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5' GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCATTAGGAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCTTCCGCTTTGAAATTAGGGGTCCCATCT
CGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGCCCCGATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGACATTAAACGA 3' (SEQ ID NO:154)

Secuencia de aminoácidos

5' DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNYLA WYQQKPGKVPKLLIY AASALKL GVPS RPSGSGSGTDPTLTISSLQPEDVATYYC QKYNSAPIT FGQGTRLDIKR 3' (SEQ ID NO:155)

TABLA 35. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.21.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	SEQ ID NO:156
CDR1	RASQGIRNILA	24-34	SEQ ID NO:157
FR2	WYQQKPGKVPKLLIY	35-49	SEQ ID NO:158
CDR2	AASALKL	50-56	SEQ ID NO:159
FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	57-88	SEQ ID NO:160
CDR3	QKYNSAPIT	89-97	SEQ ID NO:161
FR4	FGQGTRLDIKR	98-108	SEQ ID NO:162
*Residuos de AA de SEQ ID NO:155			

Anticuerpo -2.22.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGAACCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTATTTCTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAACACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTTGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAC
TATTACTATGATACTAGTGGTTTTTCCTACCGTTACGACTGGTACTACGGTATGGACGTC
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:163)

Secuencia de aminoácidos

5' QVQLEQSGPGLVKPSQNLSLTCTVS GGSISSGGYFWS WIRQHPGKGLEWIG YIYYSGNTY
YNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR DYYYDTSGPSYRYDWYYGMDV
WGQGTTVTVSSA 3' (SEQ ID NO:164)

TABLA 36. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.22.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLEQSGPGLVKPSQNLSLTCTVS	1-25	SEQ ID NO:165
CDR1	GGSISSGGYFWS	26-37	SEQ ID NO:166
FR2	WIRQHPGKGLEWIG	38-51	SEQ ID NO:167
CDR2	YIYYSGNTYYNPSLKS	52-67	SEQ ID NO:168
FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	68-99	SEQ ID NO:169
CDR3	DYYYDTSGFSYRYDWYYGMDV	100-120	SEQ ID NO:170
FR4	WGQGTTVTVSSA	121-132	SEQ ID NO:171
*Residuos de AA de SEQ ID NO:164			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5' GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAACATAATACTTACCCGGCGTTCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAAATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:172)

Secuencia de aminoácidos

5' DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNDLG WYQQKPGKAPKRLIY AASSLQN GVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC LQHNTYPA FGQGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:173)

TABLA 37. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.22.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	SEQ ID NO:174
CDR1	PASQGIRNDLG	24-34	SEQ ID NO:175
FR2	WYQQKPGKAPKRLIY	35-49	SEQ ID NO:176
CDR2	AASSLQN	50-56	SEQ ID NO:177
FR3	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	57-88	SEQ ID NO:178
CDR3	LQHNTYPA	89-97	SEQ ID NO:179
FR4	FGQGTKVEIKR	98-108	SEQ ID NO:180
*Residuos de AA de SEQ ID NO:173			

Anticuerpo - 2.24.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAAGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT
CAGGGTTCTGGATACATCTTTACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGG
AAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGTCATCTATCCTGATGACTCTGATACCAGATACAGCCCG
TCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAG
TGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATATATTACTGTGCGAGACAAAAATGGCTA
CAACACCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:181)

Secuencia de aminoácidos

5' QLVQSGAEVKKPGESLKISCQGS GYIFTNYWIG WVRQMPGKGLEWMG VIYPDDSDTRYSP
SFQG QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAIYYCAR QKWLQHPFDY WGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID
NO:182)

TABLA 38. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.24.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QLVQSGAEVKKPGESLKISCQGS	1-23	SEQ ID NO:183
CDR1	GYIFTNYWIG	24-33	SEQ ID NO:184
FR2	WVRQMPGKGLEWMG	34-47	SEQ ID NO:185
CDR2	VIYPDDSDTRYSPSFQG	48-64	SEQ ID NO:186
FR3	QVTISADKSISTAILQWSSLKASDTAIYYCAR	65-96	SEQ ID NO:187
CDR3	QKWLQHPFDY	97-106	SEQ ID NO:188
FR4	WGQGTLVTVSSA	107-118	SEQ ID NO:189
*Residuos de AA de SEQ ID NO:182			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5' GAAATTGTGTTGACGCAGTCACCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACC
CTCTCATGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGATACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGGACGTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:190)

Secuencia de aminoácidos

5' EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSC RASQSVSSRYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPRT FGQGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:191)

TABLA 39. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.24.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSC	1-23	SEQ ID NO:192
CDR1	RASQSVSSRILA	24-35	SEQ ID NO:193
FR2	WYQQKPGQAPRLLIY	36-50	SEQ ID NO:194
CDR2	GASSRAT	51-57	SEQ ID NO:195
FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY	58-88	SEQ ID NO:196
CDR3	QQYGSSPRT	89-97	SEQ ID NO:197
FR4	FGQGTKVEIKR	98-109	SEQ ID NO:198
*Residuos de AA de SEQ ID NO:191			

Anticuerpo -2.3.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5'CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC
TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTT
CAGGACAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGC
TGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTTCTTTGGTTCGGGGAGTCTCCTC
TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:199)

Secuencia de aminoácidos

5'QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQD
RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDFFGSGSLLYFDYWGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID
NO:200)

TABLA 40. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.3.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUO DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	1-25	SEQ ID NO:201
CDR1	GYTFTGYYMH	26-35	SEQ ID NO:202
FR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	SEQ ID NO:203
CDR2	WINPNSGGTNYAQKFQD	50-66	SEQ ID NO:204
FR3	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	67-98	SEQ ID NO:205
CDR3	DFFGSGSLLYFDY	99-111	SEQ ID NO:206
FR4	WGQGTLVTVSSA	112-123	SEQ ID NO:207
*Residuos de AA de SEQ ID NO:200			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAG
TCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGGTGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC
ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGA
CAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAC
CTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:208)

Secuencia de aminoácidos

5'DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHSGGKTYLY WYLQRPGQPPQLLIY EVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSIHLPLT FGGGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:209)

TABLA 41. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.3.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	1-23	SEQ ID NO:210
CDR1	KSSQSLLHSGGKTILY	24-39	SEQ ID NO:211
FR2	WILQRPGQPPQLLIY	40-54	SEQ ID NO:212
CDR2	EVSNRFS	55-61	SEQ ID NO:213
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLICISRVEAEDVGVYYC	62-93	SEQ ID NO:214
CDR3	MQSIHLPLT	94-102	SEQ ID NO:215
FR4	FGGGTKVEIKR	103-113	SEQ ID NO:216
*Residuos de AA de SEQ ID NO:209			

Anticuerpo -2.6.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5'CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC
TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACA
AGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTT
CAGGACAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGC
TGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTTCTTTGGTTCGGGGAGTCTCCTC
TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:309)

Secuencia de aminoácidos

5'QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMH WVRQAPGQGLEWMG WINPNSGGTNYAQKFQD
RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR DFFGSGSLLYFDY WGQGTLVTVSSA 3' (SEQ ID
NO:310)

TABLA 42. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.6.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	1-25	311
CDR1	GYTFTGYYMH	26-35	312
FR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	313
CDR2	WINPNSGGTNYAQKFQD	50-66	314
FR3	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	67-98	315
CDR3	DFFGSGSLLYFDY	99-112	316
FR4	WGQGTLVTVSSA	113-124	317
*Residuos de AA de SEQ ID NO:310			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAG
TCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGGTGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC
ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGA
CAGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAC
CTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:318)

Secuencia de aminoácidos

5'DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHSGGKTYLY WYLQRPGQPPQLLIY EVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSIHLPLT FGGGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:319)

TABLA 43. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.6.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	1-23	320
CDR1	KSSQSLLHSGGKTILY	24-39	321
FR2	WILQRPGQPPQLLIY	40-54	322
CDR2	EVSNRFS	55-61	323
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	62-93	324
CDR3	MQSIHLPLT	94-102	325
FR4	FGGGTKVEIKR	103-113	326
*Residuos de AA de SEQ ID NO:319			

Anticuerpo -2.7.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAATAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATGAG
GAATACTACTATGTTTCGGGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGCC 3' (SEQ ID NO:217)

Secuencia de aminoácidos

5' QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFNNYGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYY
ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DEEYYYVSGLDY WGQGTLVTVSSA 3'
(SEQ ID NO:218)

TABLA 44. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.7.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAAS	1-25	SEQ ID NO:219
CDR1	GFTFNNYGMH	26-35	SEQ ID NO:220
FR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	SEQ ID NO:221
CDR2	VIWYDGSIVKYYADSVKG	50-66	SEQ ID NO:222
FR3	RFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDTAVYYCAK	67-98	SEQ ID NO:223
CDR3	DEEYYYVSGLDY	99-110	SEQ ID NO:224
FR4	WGQGTLVTVSSA	111-122	SEQ ID NO:225
*Residuos de AA de SEQ ID NO:218			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5' CTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAAGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTT
CCTAATCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTT
GCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGCCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG
GTGGAGATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:226)

Secuencia de aminoácidos

5' LTQSPSSLSASVRDRVTITC RASQDISNYLA WYQQKPGKVPNLLIY AASTLQS GVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QKYNSAPLT FGGGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:227)

TABLA 45. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.7.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	LTQSPSSLSASVRDRVTITC	1-20	SEQ ID NO:228
CDR1	RASQDISNILA	21-31	SEQ ID NO:229
FR2	WYQQKPGICVPNLLIY	32-46	SEQ ID NO:230
CDR2	AASTLQ	47-52	SEQ ID NO:231
FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	53-84	SEQ ID NO:232
CDR3	QKYNSAPLT	85-93	SEQ ID NO:233
FR4	FGGGTKVEIKR	94-104	SEQ ID NO:234
*Residuos de AA de SEQ ID NO:227			

Anticuerpo - 2.8.1

Región variable de la cadena pesada

Secuencia de nucleótidos

5' CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGACACCCACACAGACCCTCACGCTG
ACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTGGTGGAATGGGTGTGGGCTGGATCCGT
CAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGACTGGCTTACACTCATTTATTGGAATGATGATAAGCAC
TACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTTACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTG
GTCCTTAGAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACTTATTACTGTGCACACCTG
CATTACGATATTTTGACTGGTTTTAACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:235)

Secuencia de aminoácidos

5' QITLKESGPTLVTPTQTLTLTCTFS GFSLSTGGMGVG WIRQPPGKALDWLT LIYWNDDKH
YSPSLKS RLTITKDTSKNQVVLRMTNMDPVDTATYYCAH LHYDILTGFNFDY WGQGTLVTVSSA 3'
(SEQ ID NO:236)

TABLA 46. Dominios de la región V de la cadena pesada de 2.8.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	QITLKESGPTLVTPTQTLTLTCTFS	1-25	SEQ ID NO:237
CDR1	GFSLSTGGMGVG	26-37	SEQ ID NO:238
FR2	WIRQPPGKALDWLT	38-51	SEQ ID NO:239
CDR2	LIYWNDDKHYSPSLKS	52-67	SEQ ID NO:240
FR3	RLTITKDTSKNQVVLRMTNMDPVDTATYYCAH	68-99	SEQ ID NO:241
CDR3	LHYDILTGFNFDY	100-112	SEQ ID NO:242
FR4	WGQGTLVTVSSA	113-124	SEQ ID NO:243
*Residuos de AA de SEQ ID NO:236			

Región variable de la cadena ligera

Secuencia de nucleótidos

5'GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGG
TCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTC
TCCACAGCTCCTGATCTATACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAG
GCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTATA
GAGTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3' (SEQ ID NO:244)

Secuencia de aminoácidos

5'DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLDSDDGNTYLD WYLQKPGQSPQLLIY TLSYRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQRIEFPLT FGGGTKVEIKR 3' (SEQ ID NO:245)

TABLA 47. Dominios de la región V de la cadena ligera de 2.8.1.

REGIÓN	SECUENCIA	RESIDUOS DE AA*	SEQ ID
FRI	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC	1-23	SEQ ID NO:246
CDR1	RSSQSLLDSDDGNTILD	24-40	SEQ ID NO:247
FR2	WILQKPGQSPQLLIY	41-55	SEQ ID NO:248
CDR2	TLSYRAS	56-62	SEQ ID NO:249
FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	63-94	SEQ ID NO:250
CDR3	MQRIEFPLT	95-103	SEQ ID NO:251
FR4	FGGGTKVEIKR	103-114	SEQ ID NO:252
*Residuos de AA de SEQ ID NO:245			

Ejemplo 16: Uso de anticuerpos dirigidos contra GPNMB como agente de diagnóstico

Detección de antígeno de GPNMB en una muestra:

A continuación se da un protocolo para un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de antígeno de GPNMB en una muestra. En el ensayo, los pocillos de una placa de microtitulación, tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos o una placa de microtitulación de 384 pocillos, se adsorben durante varias horas con un primer anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra GPNMB. El anticuerpo inmovilizado hace de anticuerpo de captura para cualquiera de las GPNMB que puedan estar presentes en una muestra de ensayo. Los pocillos se aclaran y se tratan con un agente de bloqueo tal como proteína de la leche o albúmina para prevenir la adsorción no específica del analito.

Posteriormente, los pocillos se tratan con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno de GPNMB, o con una disolución que contiene una cantidad patrón de antígeno de GPNMB. Una muestra tal puede ser, por ejemplo, una muestra de suero que se sospecha que tiene niveles de GPNMB en circulación que se considera que son diagnósticos de una patología.

Después de aclarar la muestra de prueba o patrón, los pocillos se tratan con un segundo anticuerpo dirigido contra GPNMB monoclonal completamente humano que está marcado por conjugación con biotina. El anticuerpo dirigido contra GPNMB marcado hace de anticuerpo de detección. Después de aclarar el exceso del segundo anticuerpo, los pocillos se tratan con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina y un sustrato cromogénico adecuado. La concentración de antígeno en las muestras de prueba se determina comparando con una curva patrón desarrollada a partir de las muestras patrón.

Este ensayo de ELISA proporciona un ensayo altamente específico y muy sensible para la detección del antígeno de GPNMB en una muestra de prueba.

Determinación de la concentración de antígeno de GPNMB en pacientes:

También puede usarse un ELISA de tipo sándwich para cuantificar los niveles de GPNMB en suero humano. Los 2 anticuerpos dirigidos contra GPNMB monoclonales completamente humanos usados en el ELISA de tipo sándwich reconocen diferentes epítopos sobre la molécula de GPNMB. El ELISA se realiza del siguiente modo: se recubren placas de ELISA (Fisher) con 50 µl de anticuerpo de captura dirigido contra GPNMB en tampón de recubrimiento ($NaHCO_3$ 0,1 M, pH 9,6) a una concentración de 2 µg/mL. Después de la incubación a 4ºC durante la noche, las placas se tratan con 200 µl de tampón de bloqueo (BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%, timerosal al 0,01% en PBS) durante 1 h a 25ºC. Las placas se lavan (3x) usando Tween 20 al 0,05% en PBS (tampón de lavado, WB). Se diluyen sueros normales o de pacientes (Clinomics, Bioreclaimation) en tampón de bloqueo que contiene suero humano al 50%. Las placas se incuban con muestras de suero durante la noche a 4ºC, se lavan con WB y luego se incuban con 100 µl/pocillo de anticuerpo dirigido contra GPNMB de detección biotinilado durante 1 h a 25ºC. Después del lavado, las placas se incuban con HRP-estreptavidina durante 15 min, se lavan como antes y luego se tratan con 100 µl/pocillo de o-fenilendiamina en H_2O_2 (disolución de revelado de Sigma) para la generación de color. La reacción se detiene con 50 µl/pocillo de H_2SO_4 (2 M) y se analiza usando un lector de placas de ELISA a 492 nm. La concentración de antígeno de GPNMB en muestras de suero se calcula comparando con diluciones de antígeno de GPNMB purificado usando un programa de ajuste de curvas de cuatro parámetros.

Estadificación de cáncer en un paciente:

Se apreciará que basándose en los resultados expuestos y tratados en los ejemplos de diagnóstico anteriores es posible estadificar un cáncer en un sujeto basándose en los niveles de expresión del antígeno de GPNMB. Para un tipo dado de cáncer (por ejemplo, melanoma) se toman muestras de sangre de los sujetos diagnosticados como que están en diversos estadios en la progresión de la enfermedad, y/o en diversos momentos en el tratamiento terapéutico del cáncer. La concentración del antígeno de GPNMB presente en las muestras de sangre se determina usando un procedimiento que determina específicamente la cantidad de antígeno que está presente. Un procedimiento tal incluye un procedimiento de ELISA tal como el procedimiento descrito en los ejemplos de diagnóstico previos. Usando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada estadio de progresión o terapia se designa un intervalo de concentraciones de antígeno que puede considerarse característico de cada fase.

Con el fin de estadificar la progresión del cáncer en un sujeto en estudio, o de caracterizar la respuesta del sujeto a un desarrollo de la terapia, se toma una muestra de sangre del sujeto y se determina la concentración del antígeno de GPNMB presente en la muestra. La concentración así obtenida se usa para identificar en qué intervalo de concentraciones se encuentra el valor. El intervalo así identificado guarda una relación con un estadio de progresión o un estadio de terapia identificado en las diversas poblaciones de sujetos diagnosticados, proporcionándose así un estadio en el sujeto en estudio.

Ejemplo 17: Diagnóstico de cáncer con anticuerpos dirigidos contra GPNMB

Se identifica un sujeto que se sospecha que tiene un tumor de cáncer de ovario y se extirpa una muestra de tejido del tumor sospechoso para el ensayo. Entonces, el tejido extirpado se pone en contacto con anticuerpos dirigidos contra GPNMB que tienen una marca colorimétrica. Se hace una determinación de si los anticuerpos dirigidos contra GPNMB se unen específicamente al tejido extirpado. La unión es indicativa de tejido canceroso, mientras que la ausencia de unión es indicativa de tejido no canceroso. Por consiguiente, se diagnostica la afección del paciente para facilitar el posterior ensayo, asesoramiento y/o tratamiento.

Ejemplo 18: Tratamiento de cáncer con anticuerpos dirigidos contra GPNMB

La elección como diana de GPNMB en células tumorales es útil para tratar un sujeto en riesgo de o aquejado de cáncer. Un sujeto tal se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo dirigido contra GPNMB de la presente invención. Normalmente, los anticuerpos se administran en una clínica de consultas externas mediante administración semanal de aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg de dosis mediante infusión intravenosa (IV) lenta. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada de un anticuerpo es seleccionada por un médico práctico y oscilaría aproximadamente de 1 µg/kg a 20 mg /kg, de 1 µg/kg a 10 mg/kg, de 1 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 100 µg/kg a 1 mg/kg y de 500 µg/kg a 5 mg/kg.

Los anticuerpos también se usan para prevenir y/o reducir la gravedad y/o los síntomas de enfermedad asociados a trastornos relacionados con GPNMB.

Para probar la eficacia clínica de anticuerpos en seres humanos, los individuos con cáncer, particularmente, pero no se limitan a, carcinoma de ovario, pulmón o colon, se identifican y se aleatorizan en grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo que no recibe tratamiento con anticuerpos y grupos tratados con diferentes dosis de anticuerpo dirigido contra GPNMB. Los individuos son eventualmente seguidos y los individuos que reciben tratamiento con anticuerpos presentan una mejora en su afección.

Ejemplo 19: La especificidad de los efectos antitumorales de CR011-vcMMAE (CR011-ONC-1)

El estudio se realizó para determinar los efectos antitumorales de los componentes constituyentes del conjugado anticuerpo-fármaco y su formulación y para referir estos efectos a los efectos antitumorales del inmunoconjugado intacto.

Resultados:

Se implantaron fragmentos de melanoma SK-ME-2 mediante trocar en ratones y, después de que los tumores se establecieran, se probó el tratamiento con CR011-vcMMAE y diversos componentes para demostrar la especificidad de efectos antitumorales de este agente. Los grupos de control, dosificados con o bien la solución salina tamponada con fosfato (vehículo) o los excipientes de la preparación del inmunoconjugado (DMSO al 3%, sacarosa, medio de fosfato) aumentaron regularmente el tamaño del tumor hasta un máximo de 2.000 mg, momento en el que se sacaron del estudio. No se observaron efectos antitumorales aparentes o estadísticamente significativos. Sin embargo, el tratamiento con CR011-vcMMAE (a 5 mg/kg/tratamiento, q4d x4) produjo inhibición medible después de las 2 primeras dosis. La inhibición del crecimiento tumoral continuó hasta que no se detectó tumor apreciable en 6 de los animales experimentales (Figura 4). En estudios preliminares, la regresión tumoral fue completa y no fue seguida de

recrecimiento del tumor a pesar de periodos de observación prolongados (hasta 200 días).

Conclusiones:

Las regresiones producidas por el inmunoconjugado no se debieron a los componentes individuales del inmunoconjugado ni a los componentes de formulación de ese inmunoconjugado. Esto se demuestra por la falta de inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento con anticuerpo CR011 solo (grupo 3) o monometilauristatina E libre (grupo 4), en la que las dosis aplicadas fueron idénticas a las contenidas en el inmunoconjugado intacto. Además, la falta de efectos antitumorales observados con MMAE libre sugiere que los efectos antitumorales de MMAE como resultado de una baja liberación del conjugado anticuerpo-fármaco no pueden explicar los efectos antitumorales del inmunoconjugado. Se ha mostrado que la liberación de MMAE de los conjugados anticuerpo-MMAE es un procedimiento muy lento in vivo ($T_{½}\beta$ = 6,0 días en el caso del inmunoconjugado de anticuerpo dirigido contra CD30-auristatina E (Sanderson y col., Clin. Cancer Res. 11: 843-852 (2005)) y proporcionaría concentraciones en plasma o en suero que serían considerablemente más bajas que las dosis en "bolo" usadas en este estudio, que fueron ineficaces en la ralentización del crecimiento de los xenoinjertos de melanoma humano.

Ejemplo 20: CR011-vcMMAE inhibe el crecimiento de xenoinjertos de melanoma humano SK-MEL-5 conduciendo a regresión completa de tumores de melanoma establecidos en ratones atímicos (CR011-ONC-3)

Este estudio se realizó para evaluar la potencia y la eficacia terapéutica del conjugado anticuerpo-fármaco, CR011-vcMMAE, contra un segundo modelo de melanoma humano establecido, el xenoinjerto SK-MEL-5.

Resultados:

Aunque son de origen sin relacionar, SK-MEL-5 expresa GPNMB sobre la superficie de la membrana celular y es destruido por CR011-vcMMAE in vitro. En este estudio se examinaron los efectos antitumorales del inmunoconjugado de CR011, junto con los vehículos PBS y solución salina, y los agentes de referencia vinblastina y paclitaxel. De un modo similar al tumor SK-MEL-2, la vinblastina produjo una inhibición perceptible, pero no significativa, del crecimiento tumoral ($P \leq 0,21$) cuando se comparó con grupos de control de solución salina y PBS (Figura 5). Sin embargo, poco después del comienzo del tratamiento con paclitaxel se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($P \leq 0,039$) en el día 3 después de empezar el tratamiento, y este efecto antitumoral continuó, produciendo el 100% de la inhibición del crecimiento (estasis). Las respuestas de animales experimentales que llevaban SK-MEL-5 a vinblastina y paclitaxel fueron efímeras. Después de cesar el tratamiento a las dosis máximamente toleradas, los tumores reanudaron el rápido crecimiento progresivo. Se produjo un superviviente libre de tumor a largo plazo en el grupo de paclitaxel y se produjo una regresión espontánea en el grupo tratado con solución salina.

La inhibición sustancial del crecimiento tumoral, además del retraso del crecimiento tumoral y las regresiones completas producidas en animales que tenían tumores SK-MEL-5 después del tratamiento con CR011-vcMMAE, y estos efectos estuvieron relacionados con la dosis. A 10 mg/kg/tratamiento ya se notaron efectos antitumorales significativos 7 días (el equivalente de 2 tratamientos) después de empezar el tratamientos cuando se comparó con solución salina ($P \leq 0,0096$), y ya 10 días después de empezar el tratamiento cuando se comparó con controles tratados con PBS ($P = 0,039$). En un modo relacionado con la dosis, CR011-vcMMAE produjo un retraso del crecimiento tumoral que condujo a regresiones completas de xenoinjertos establecidos del melanoma SK-MEL-5 (véase el inserto en forma de tabla a la Figura 5 para las proporciones de animales con regresiones completas). Las regresiones completas se produjeron a las dosis de CR011-vcMMAE de 2,5 mg/kg/tratamiento, pero no a 1,25 mg/kg/tratamiento.

Como en estudios previos, no se produjo indicación de toxicidad por el inmunoconjugado en animales tratados como se demuestra por la mortalidad de los efectos sobre el peso corporal o el aumento de peso.

Conclusiones:

CR011-vcMMAE ejerce efectos antitumorales sustanciales dependientes de la dosis contra xenoinjertos establecidos del melanoma humano SK-MEL-5. Después de sólo uno o dos tratamientos se observa una inhibición significativa del crecimiento tumoral y que conduce a supervivientes libres de tumor a largo plazo. Las regresiones completas se produjeron a dosis de ≥ 2,5 mg/kg i.v., q4d X4.

Ejemplo 21: Farmacocinética de CR011-vcMMAE (CR011-PK-1A)

El fin de este estudio era determinar la estabilidad de CR011-vcMMAE in vivo después de la inyección intravenosa, la ruta esperada de administración clínica.

Materiales y procedimientos.

El componente de anticuerpo CR011 de CR011-vcMMAE se midió por un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich en el que se añadió suero a los pocillos de placas de microtitulación recubiertas con el antígeno relacionado (GPNMB, CG56972-03) para el anticuerpo CR011, y la cantidad de anticuerpo humano se detectó con una anti-globulina conjugada al generador de señales (peroxidasa de rábano picante).

Resultados:

Farmacocinética. La persistencia de la disponibilidad del compuesto para el componente de anticuerpo de CR011-vcMMAE se examinó en un estudio farmacocinético en ratones atímicos (estudio CR011-PK-1, Figura 6). El perfil de la concentración de suero-tiempo para el conjugado de anticuerpo-fármaco se determinó en ratones atímicos después de la administración intravenosa de CR011-vcMMAE y los resultados se presentan en la Figura 6. Los ratones atímicos que recibieron 1 ó10 mg/kg intravenosamente mostraron concentraciones en suero proporcionales a la dosis con respecto a la duración completa de las veces de muestreo (42 días). El patrón de concentración-tiempo fue bifásico. Sin embargo, la fase inicial (α) fue menor ya que contribuyó a <2% del ABC total. Sin embargo, el compuesto desapareció muy lentamente de la sangre periférica (T½β = 10,3 días) con concentraciones en suero de 1 µg/ml y 10 µg/ml que quedaron en la sangre durante 6 semanas después de la dosificación.

Los cálculos aproximados de los parámetros farmacocinéticos para CR011-vcMMAE se presentan en la Tabla 48. Es de interés un parámetro. El volumen de distribución en el estado estacionario (Vss) es muy bajo, aproximándose al mínimo teórico; esto sugiere que el compuesto no se distribuye fuera del espacio extravascular. El patrón de distribución, además de la fase de eliminación β para CR011-vcMMAE, guardan una buena relación con valores obtenidos para anticuerpos en general (véase Revisiones de Mahmood y Green, Clin. Pharmacokinet 44: 331-347 (2005); o Lobo y col. J. Pharm. Sci. 93: 2645-2668 (2004)) y guardan relación con valores obtenidos para un inmunoconjugado de anticuerpo-auristatina E con carga de fármaco comparable (Hamblett y col., Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070 (2004)).

Tabla 48. Parámetros PK de CR011-vcMMAE después de la administración intravenosa.

Parámetro	Unidades	1 mg/kg	10 mg/kg
A	**µg/ml**	**8,97**	**74,6**
B	**µg/ml**	**9,82**	**113**
Alfa	**1/h**	**0,179**	**0,0812**
Beta	**1/h**	**0,00269**	**0,00281**
ABC	**h*µg/ml**	**3712**	**41210**
Semivida alfa	**h**	**3,88**	**8,531**
Semivida beta	**h**	**258**	**247**
Volumen	**ml/kg**	**53,2**	**53,2**
Cmáx	**µg/ml**	**18,8**	**188**
Cl	**ml/h/kg**	**0,269**	**0,243**
MRT	**h**	**368**	**348**
Vss	**ml/kg**	**99,0**	**84,5**

Abreviaturas: A: Constante preexponencial para la fase alfa; Alfa: Constante de velocidad exponencial para la fase alfa; ABC: Área total bajo la curva de 0 al infinito; B: Constante preexponencial para la fase beta; Beta: Constante de velocidad exponencial para la fase beta; Cl: Eliminación total o sistémica; Cmáx: Concentración máxima observada; MRT: Tiempo de residencia medio; Volumen: Volumen del compartimento central; Vss: Volumen de distribución en el estado estacionario.

Los cálculos aproximados para los parámetros farmacocinéticos se presentan en la Tabla 48. Es de interés un parámetro. El volumen de distribución en el estado estacionario (Vss) se aproxima al mínimo teórico. Estos datos sugieren que el compuesto no se distribuyó fuera del espacio extravascular. Se consideran en conjunto que estos datos guardan una buena relación con los datos en otros inmunoconjugados que llevan el resto citotóxico -vcMMAE (véase Hamblett y col., Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070 (2004)).

Conclusiones:

El conjugado de anticuerpo-fármaco CR011-vcMMAE tiene un perfil de concentración en suero que favorece la exposición continua suficiente para la perturbación y erradicación de xenoinjertos de melanoma. El inmunoconjugado después de la administración i.v. tiene una semivida suficientemente larga para garantizar la exposición de células tumorales durante periodos prolongados (T½β = 10,3 días), y puede no requerir dosificación frecuente. La durabilidad de

CR011-vcMMAE in vivo (por ejemplo, ratones atímicos) es comparable a la de otros inmunoconjugados de auristatina E.

Ejemplo 22: La dependencia del programa de los efectos antitumorales de CR011-vcMMAE (CR011-ONC-1)

El fin de este estudio era determinar el grado al que los efectos antitumorales curativos del conjugado de anticuerpo CR011-fármaco dependen de la pauta de dosificación y, si es posible, determinar el intervalo de dosificación óptimo para este modelo de xenoinjerto.

Materiales y procedimientos:

El protocolo para este estudio se presenta en la Tabla 49. Para probar la hipótesis de que los efectos antitumorales curativos están influidos por el programa de dosificación, los efectos antitumorales de CR011-vcMMAE se midieron a 5 intervalos de dosificación diferentes (es decir, 0, 1, 4, 8 y 16 días entre tratamientos) y para cada intervalo de dosificación se emplearon 3 niveles dosificación (es decir, dosis acumuladas de 2, 8 y 32 mg/kg); para cada grupo, n= 6 ratones atímicos.

Fíjese bien: por favor, obsérvese que aunque los 5 conjuntos de grupos en este experimento (por ejemplo, los grupos 5, 6 y 7 representan un conjunto y recibieron 32, 8 y 2 mg/kg de dosis acumuladas, respectivamente) recibieron las mismas dosis acumuladas, el primer conjunto que recibió la “dosis en bolo” es diferente de los otros 4 conjuntos. La Cmáx para cada grupo en el conjunto en “bolo” era probablemente cuatro veces superior a la Cmáx para los otros 4 conjuntos (véase la sección sobre farmacocinética para la linealidad de dosis después de la administración i.v.), ya que los 4 conjuntos de grupos recibieron 4 tratamientos, mientras que el primer conjunto sólo recibió un tratamiento en “bolo” (véase la columna 7, Tabla 49 a continuación).

TABLA 49. Protocolo para el estudio del intervalo de dosificación (CR011-PHM-2).

Grupo	Tratamiento	ROA	Dosis (mg/kg)	Pauta	**Intervalo de dosificación (días)**	Nº de tratamientos (n)	Dosis acumuladas (mg/kg)
1	Solución salina tamponada con fosfato			Bolo	**0**	1	N.A.
2	CR011-AE	i.v.	32	Bolo	**0**	1	32
3	CR011-AE	i.v.	8	Bolo	**0**	1	8
4	CR011-AE	i.v.	2	Bolo	**0**	1	2
5	CR011-AE	i.v.	8	qd x4	**1**	4	32
6	CR011-AE	i.v.	2	qd x4	**1**	4	8
7	CR011-AE	i.v.	0,5	qd x4	**1**	4	2
8	CR011-AE	i.v.	8	q4d x4	**4**	4	32
9	CR011-AE	i.v.	2	q4d x4	**4**	4	8
10	CR011-AE	i.v.	0,5	q4d x4	**4**	4	2
11	CR011-AE	i.v.	8	q8d x4	**8**	4	32
12	CR011-AE	i.v.	2	q8d x4	**8**	4	8
13	CR011-AE	i.v.	0,5	q8d x4	**8**	4	2
14	CR011-AE	i.v.	8	q16d x4	**16**	4	32
15	CR011-AE	i.v.	2	q16d x4	**16**	4	8
16	CR011-AE	i.v.	0,5	q16d x4	**16**	4	2
17	Excipientes	i.v.	N.A.	q16d x4	**16**	4	N.A.

Resultados:

Para este estudio, la frecuencia de regresiones completas con supervivientes libres de tumores a largo plazo se determinó empíricamente después de 5 intervalos de dosificación diferentes (es decir, 0, 1, 4, 8 y 16 días entre tratamientos). Las respuestas globales para cada conjunto de grupos, en las que un conjunto se define como 3 grupos de niveles de dosificación graduados, pero un intervalo de dosificación (los grupos 5, 6 y 7 representan 1 conjunto, tratándose todos con un intervalo de dosificación de 1 día), se muestran en la Figura 7. Las respuestas globales para animales experimentales que responden a CR011-vcMMAE parecen sugerir que la dosificación en bolo y los intervalos

de 1 día y 4 días proporcionan una ventaja muy ligera a la proporción de curaciones en comparación con intervalos más largos tales como 8 días y 16 días entre dosis. Sin embargo, este efecto no era significativo (P <0,2904). Por tanto, los datos sugieren que los efectos antitumorales de CR011-vcMMAE en el modelo SK-MEL-2 no dependen del programa. Esta conclusión está reforzada por el hecho de que animales experimentales en el conjunto en bolo (grupos 2, 3 y 4) que se expusieron a concentraciones en plasma de aproximadamente cuatro veces superiores a cualquiera de los otros grupos no mostraron ningún porcentaje superior de sujetos curados.

El diseño original de este estudio se extendió para incluir un examen de los efectos de diversos niveles de dosificación. Para caja conjunto, un grupo de animales recibió una dosis acumulada de 8 mg/kg que, de estudios previos que emplean un intervalo de dosificación de 4 días, proporcionó efectos terapéuticos consecuentes que condujeron a animales libres de tumor a largo plazo. Además, se emplearon dosis acumuladas de 2 mg/kg y 32 mg/kg.

Los efectos de niveles de dosificación, conjuntamente con diversos intervalos de dosificación, se presentan en la Figura 8. Los ratones atímicos que recibieron una dosis acumulada de 32 mg/kg mostraron regresiones completas en el 100% de cada grupo, independientemente del intervalo de dosificación; es decir, una dosis acumulada de 32 mg/kg es independiente del programa y representa una dosis que está muy por encima de la suficiente para regresiones completas en el 100% de los animales experimentales (5 grupos de 6 animales/grupo = 30 animales experimentales). Los animales que recibieron 8 mg/kg de dosis acumulada no demostraron dependencia del programa y mostraron casi las mismas proporciones de regresiones completas (es decir, 28/30 = 93%); los animales experimentales que recibieron 2 mg/kg (dosis acumulada), que se reconoció en estudios preliminares que estaba por debajo del umbral para curaciones (usando una pauta normalizada de q4d X4), parecieron ser dependientes del programa, aunque esto no fue significativo y produjo una proporción mucho más baja de regresores completos (es decir, el 13%).

Conclusiones:

Los datos del estudio de intervalos de dosificación sugieren que las respuestas de xenoinjertos de melanoma SK-MEL-2 no dependen del programa de administración de CR011-vcMMAE. Aunque no pudo mostrarse ninguna ventaja para la dosificación o pautas en bolo con bajos intervalos de dosificación, se sugiere que debajo de una cierta dosis acumulada puede haber alguna ventaja para combinar tratamientos múltiples es una única dosis en bolo.

Ejemplo 23: Expresión del transcrito de GPNMB en melanoma humano

Se mostró recientemente que la GPNMB se expresaba en glioblastoma y mediaba en la invasividad in vitro y in vivo de células tumorales derivadas de glioblastoma (véanse, por ejemplo, Loging y col., Genome Res. 10:1393-1402 (2000); y Rich y col., J. Biol. Chem. 278:15951-15975 (2003)). Para confirmar y extender estos hallazgos a tipos de cáncer adicionales, los inventores examinaron la expresión del transcrito de GPNMB en líneas celulares y tejidos cancerosos humanos.

Material y procedimientos:

Se aisló ARN total usando el kit RNeasy con una etapa de digestión con ADNsa (Qiagen Inc., Valencia CA). Se realizó RT-PCR usando el kit de RT-PCR de una etapa (Qiagen) del siguiente modo. RT: 50ºC durante 45 min y 95ºC durante 15 min durante 1 ciclo. PCR: 1 min a 95ºC, 1 min a 50ºC y 2 min a 72ºC durante 30 ciclos con extensión final durante 10 min a 72ºC. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2%/agarosa al 0,33% de bajo punto de fusión y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La integridad de cada muestra de ARN se verificó mediante RT-PCR con cebadores diseñados para amplificar GAPDH. Los cebadores específicos (5'-3') usados fueron:

GPNMB: Directo-GAATTCAGAGTTAAACCTTGAG (SEQ ID NO: 327)

Inverso-CAGGAATCTGATCTGTTACCAC (SEQ ID NO: 328)

MART-1: Directo-CTGACCCTACAAGATGCCAAGAG (SEQ ID NO: 329)

Inverso-ATCATGCATTGCAACATTTATTGATGGAG (SEQ ID NO: 330)

Tirosinasa: Directo-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC (SEQ ID NO: 331)

Inverso-AGGCATTGTGCATGCTGCTT (SEQ ID NO: 332)

pMEL-17: Directo-TATTGAAAGTGCCGAGATCC (SEQ ID NO: 333)

Inverso-TGCAAGGACCACAGCCATC (SEQ ID NO: 334)

El análisis por RTQ-PCR se realizó con un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 usando reactivos TaqMan (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Se usaron cantidades iguales de ARN normalizadas como molde en reacciones de PCR durante 40 ciclos con cebadores específicos de GPNMB para obtener valores de ciclo umbral (CT). Se usaron los siguientes cebadores (5'-3'):

Directo-TCAATGGAACCTTCAGCCTTA (SEQ ID NO: 335)

Inverso-GAAGGGGTGGGTTTTGAAG (SEQ ID NO: 336)

Sonda-TET-CTCACTGTGAAAGCTGCAGCACCAG-TAMRA (SEQ ID NO: 337)

Resultado:

El análisis de expresión del transcrito de los inventores indicó que la GPNMB se expresaba fuertemente en un alto porcentaje de muestras de melanoma metastásico humano. Usando RTQ-PCR se encontró que la GPNMB se expresaba altamente (CT<27,0) en 5/7 líneas celulares de melanoma y en 5/5 especímenes clínicos de melanoma examinados (Tabla 50). A diferencia, la GPNMB no se expresó en una línea celular de carcinoma renal, TK-10, que se usó como control negativo en los experimentos de los inventores.

Tabla 50: Expresión del transcrito de GPNMB en líneas celulares de melanoma humano y especímenes clínicos

	Detalles de la muestra	**Expresión***
Líneas celulares		
UACC-62	Melanoma met.	21,2
M14	Melanoma met., amelanótico	22,2
SK-MEL-5	Melanoma met., ganglio axilar	22,9
SK-MEL-28	Melanoma met., piel	24,1
WM-266-4	Melanoma met., piel	24,5
A-375	Melanoma met., piel	29,0
LOXIMVI	Melanoma met., amelanótico	30,9
TK-10	Carcinoma de células renales	40,0
Especímenes clínicos		
Nº 1	Melanoma met.	26,6
Nº 2	Melanoma	26,4
Nº 3	Melanoma	26,9
Nº 4	Melanoma met.	24,1
Nº 5	Melanoma met.	25,3

* Valores de ciclo umbral (CT) del análisis por RTQ-PCR. Met: Metastásico.

Para extender estos resultados, los inventores investigaron la expresión del transcrito de GPNMB en un panel de 17 líneas celulares de melanoma mediante RT-PCR semicuantitativa (Tabla 51). Los resultados muestran que el transcrito de GPNMB se expresa altamente en 15/17 líneas celulares de melanoma, se expresa débilmente en 1/17 líneas celulares de melanoma (A-375) y no es detectable en 1/17 líneas celulares de melanoma (LOXIMVI) ni en el control TK-10.

Tabla 51. Análisis por RT-PCR

Línea celular	Anotación	Expresión*			
		GPNMB	MART-1	Tirosinasa	pMel-17
M14	Melanoma met., amelanótico	+++	+++	+++	+++
SK-MEL-5	Melanoma met., ganglio axilar	+++	+++	+++	+++
SK-MEL-28	Melanoma met., piel	+++	+++	+++	+++
WM-266-4	Melanoma met., piel	+++	+++	+++	+++
SK-MEL-2	Melanoma met., piel	+++	+++	+++	+++
UACC-257	Melanoma met.	+++	+++	+++	+++
A2058	Melanoma met., ganglio linfático	+++	+++	+++	+++
G361	Melanoma met., piel	+++	+++	+++	+++
HT-144	Melanoma met., piel	+++	+++	+++	+++
MEWO	Melanoma met., ganglio linfático	+++	+++	+++	+++
SK-MEL-3	Melanoma met., ganglio linfático	+++	+++	+++	+++
MALME-3M	Melanoma met.	+++	+++	+++	+++
UACC-62	Melanoma met.	+++	+++	+++	-
SK-MEL-24	Melanoma met., ganglio linfático	+++	-	+++	-
RPMI-7951	Melanoma met., ganglio linfático	+++	-	+	-
A-375	Melanoma met., piel	+	-	-	-
LOXIMVI	Melanoma met., amelanótico	-	-	-	-
TK-10	Carcinoma de células renales	-	-	-	-

*Análisis por RT-PCR: Fuertemente (+++), débilmente (+) o no detectable (-). Met: Metastásico.

Además, comparando la expresión del transcrito de GPNMB con transcritos de genes asociados a melanoma/melanocito conocidos (MART-1, tirosinasa y pMEL-17) en las líneas celulares de melanoma (Tabla 51) se demostró una fuerte expresión de MART-1, tirosinasa y pMEL-17 en 13/17, 14/17 y 12/17 líneas celulares de melanoma, respectivamente. Notablemente, 12/17 muestras coexpresaron altos niveles de GPNMB y los tres genes asociados a melanoma/melanocito. Tanto las líneas celulares LOXIMVI como TK-10 que tenían expresión indetectable de GPNMB también carecieron de los tres genes asociados a melanoma/melanocito examinados.

Ejemplo 24: La actividad inhibitoria del crecimiento de CR011-vcMMAE depende de la expresión de GPNMB

Material y procedimientos:

Citometría de flujo: El análisis cuantitativo de la expresión de GPNMB sobre la superficie celular de líneas celulares se determinó por citometría de flujo. Se recogieron aproximadamente 1 x 106 células, se lavaron y se incubaron con una cantidad saturante (10 µg/mL) de o CR011 o anticuerpo de control del mismo isotipo en tampón de tinción que contenía PBS (pH 7,4), SBF al 4% y NaN3 al 0,1% durante 30 min sobre hielo, seguido de lavado y tinción con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) a 1:100 durante 30 min sobre hielo. Las células se fijaron en paraformaldehído al 1%/PBS y se examinaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur. El análisis de datos se realizó con el software Becton Dickinson Cell Quest versión 3.3 y la relación de intensidad de fluorescencia media geométrica (GMR) se determinó para cada tipo de célula.

La internalización de los anticuerpos unidos a la superficie celular se evaluó mediante un procedimiento de citometría de flujo modificado. En resumen, las suspensiones de células se marcaron con 10 µg/ml de CR011 sin conjugar o conjugado con MMAE durante 30 min sobre hielo. Después de lavar las células, la incubación se cambió a 37ºC durante 1 h para permitir la internalización de anticuerpos unidos. Las células que quedaron sobre el hielo (unidas a la superficie total) o que se incubaron a 37ºC (internalizadas) se tiñeron con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con PE a 1:100 durante 30 min para detectar CR011 conservado sobre la superficie celular. Las células marcadas se analizaron por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. El porcentaje de anticuerpo internalizado se determinó usando las GMR y la siguiente fórmula:

Porcentaje internalizado = Unidas a la superficie total (4ºC) - unidas a la

superficie total (37ºC)/Unidas a la superficie total (4ºC) x 100

Análisis de inmunoprecipitación e inmunotransferencia: Se recogieron células y se lisaron sobre hielo durante 30 min en tampón de lisis que contenía NP-40 al 1%, NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,02 M, glicerina al 10%, EDTA 0,01 M y mezcla completa de inhibidor de proteasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Los sobrenadantes se recogieron y la concentración de proteína se determinó con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). Para la inmunoprecipitación se añadieron 2 µg de anticuerpo primario a 0,5-1 mg de lisados de células totales y se incubaron a 4ºC durante 3 h, seguido de incubación con proteína A-agarosa (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) sobre hielo durante 2 h. Las perlas de agarosa se lavaron en TBST frío en hielo (PBS con Tween 20 al 0,1%). Los inmunoprecipitados se recuperaron de los sobrenadantes después de hervir en tampón de muestra de Laemmli y centrifugación.

Para el análisis de inmunotransferencia, los lisados de células totales (50 µg) o inmunoprecipitados se resolvieron bajo condición reductora en geles de Tris-glicina al 4-20% (Invitrogen) y se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF de 0,45 µm (Invitrogen). Las membranas se bloquearon con BSA al 3% (Sigma, St. Louis, MO) en TBST durante 3 h y se sondaron con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra GPNMB (1:1000) durante 3 h. Se añadió anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG (H+L) de conejo conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Labs) y se incubó durante 30 min. Las membranas se lavaron en TBST y se sometieron a quimioluminiscencia potenciada (Amersham) siguiendo el protocolo del fabricante.

Ensayos clonogénicos: La actividad inhibitoria del crecimiento de CR011-vcMMAE se determinó mediante ensayo clonogénico. Se sembraron células en placas de 96 pocillos y se dejaron recubrir durante la noche. Se añadió CR011 sin conjugar, MMAE libre, CR011-vcMMAE o anticuerpo conjugado con vcMMAE del mismo isotipo a diversas concentraciones a cultivos celulares subconfluentes y se incubaron durante 4 días a 37ºC. Entonces, las células se transfirieron a placas de 6 pocillos y se dejó que formaran colonias. Las colonias se tiñeron con tinción Giemsa (Sigma) y se contaron. Las fracciones de células supervivientes se calcularon basándose en la relación de la muestra tratada y el control sin tratar. Los resultados se expresaron como un porcentaje del control usando el software GraphPad Prism versión 4. La CI50 se definió como la concentración que produce una reducción del 50% de la formación de colonias en comparación con cultivos de control sin tratar.

Resultados:

Para demostrar que la actividad inhibitoria del crecimiento de CR011-vcMMAE depende de la expresión de GPNMB, la proteína GPNMB de longitud completa se expresó ectópicamente en células HEK293. Los análisis de inmunotransferencia (Figura 9A) y FACS (Figura 9B) confirmaron que la GPNMB se expresó en células transfectadas con GPNMB/plásmido. El tratamiento de células con CR011-vcMMAE, seguido de ensayo clonogénico, demostró que las células HEK293 que expresan GPNMB eran más sensibles a la inhibición del crecimiento mediada por CR011-vcMMAE que las células de control que carecían de expresión de GPNMB (Figura 9C).

Para verificar adicionalmente los hallazgos de los inventores, células SK-MEL-2 que expresaban GPNMB se transfectaron con ARNip para inhibir específicamente la expresión endógena de GPNMB. Los análisis de inmunotransferencia y de FACS realizados 2 y 4 días después de la transfección demostraron que los niveles de la

proteína GPNMB total (Figura 10A) y GPNMB superficial (Figura 10B) eran significativamente reducidos en células SK-MEL-2 después de la transfección cuando se compararon con los transfectantes de control. La cantidad de expresión de GPNMB se redujo durante al menos 7 días después de la transfección. El tratamiento de estas células con CR011-vcMMAE demostró que las células SK-MEL-2 eran menos sensibles a la actividad inhibitoria del crecimiento de CR011-vcMMAE tras el silenciamiento de GPNMB mediado por ARNip (Figura 10C). Considerados en conjunto, estos datos indican que la actividad inhibitoria del crecimiento de CR011-vcMMAE requirió la expresión de GPNMB de la superficie celular.

Ejemplo 25: Detención del ciclo celular e inducción de apoptosis por CR011-vcMMAE

Para evaluar el mecanismo de CR011-vcMMAE de inhibición del crecimiento se realizó el análisis del ciclo celular.

Material y procedimientos:

Los efectos del ciclo celular de CR011-vcMMAE se evaluaron después de tratar células en medio de crecimiento completo durante 24 ó 48 h. Brevemente, las células se pulsaron en los momentos indicados con 30 µM de bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) durante 30 min, se recogieron, se fijaron y se permeabilizaron en metanol. La síntesis de ADN naciente se detectó por tinción con antibromodesoxiuridina-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA). El contenido de ADN total se detectó usando yoduro de propidio (PI, Sigma). Para el análisis de la apoptosis, las células se trataron como antes y se marcaron con anexina V-FITC seguido de exclusión con yoduro de propidio usando el kit I de detección de apoptosis de anexina V-FITC (BD PharMingen, San Diego, CA) según los protocolos del fabricante. Se usó citometría de flujo (como se ha descrito en el ejemplo previo) para ensayar tanto los estudios de ciclo celular como de apoptosis.

Resultados:

Las células SK-MEL-2 positivas o las células de control TK-10 negativas para GPNMB se trataron con CR011-vcMMAE durante diversas duraciones de tiempo, seguido de bromodesoxiuridina durante 30 minutos para detectar la síntesis de ADN naciente y finalmente yoduro de propidio para detectar el contenido de ADN total. La síntesis de ADN y la progresión del ciclo celular se determinaron por citometría de flujo (Tabla 52).

Tabla 52. Análisis del ciclo celular de células tratadas con CR011-vcMMAE

Tratamiento (ng/ml)	**% de G_1**	**% de fase S**	**% de G_2/M**	**% de sub-G_1**
SK-MEL-2				
24 horas				
Sin tratar	55,2	30,0	9,9	0,5
CR011 (1000)	63,6	25,2	6,4	0,5
IgG2-vcMMAE (1000)	65,9	21,8	5,8	0,8
CR011-vcMMAE (100)	56,0	26,9	12,4	0,2
CR011-vcMMAE (1000)	43,7	20,0	28,5	1,1
TK-10				
24 horas				
Sin tratar	39,7	43,7	7,0	0,5
CR011 (1000)	42,0	39,8	6,3	0,3
IgG2-vcMMAE (1000)	42,8	40,2	5,9	0,3
CR011-vcMMAE (100)	51,1	35,1	4,5	0,7
CR011-vcMMAE (1000)	52,6	34,2	3,9	0,8

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo por citometría de flujo y los porcentajes de células en cada fase de ciclo celular se determinaron por el software CellQuest (Becton Dickinson).

La exposición de células positivas para GPNMB a 1000 ng/mL de CR011-vcMMAE, pero no al control de isotipo IgG2-vcMMAE durante 24 h, produjo una disminución del porcentaje (10%) de células en G1 y fase S y un aumento del porcentaje (18,6 %) de células en G2/M cuando se comparó con células sin tratar. A diferencia, CR011-vcMMAE no afectó el ciclado de células negativas para GPNMB. 48 h después del tratamiento, CR011-vcMMAE redujo adicionalmente el porcentaje (11%) de células en G1 y fase S y aumentó el porcentaje (24%) de células en G2/M.

El aumento en la población sub-G1 tras el tratamiento con CR011-vcMMAE sugirió la aparición de apoptosis. Para investigar esta posibilidad se realizó el análisis de apoptosis usando la unión a la superficie de anexina V y la pérdida de exclusión de yoduro de propidio (PI). Los resultados de los inventores mostraron que 1000 ng/ml de CR011-vcMMAE indujeron apoptosis específicamente en células que expresaban GPNMB como se indica por un aumento del 11% en las células monoteñidas (anexina V+/PI-) tras 48 h de tratamiento con CR011-vcMMAE (Tabla 53).

Tabla 53. Inducción de apoptosis en células de melanoma humano por CR011-vcMMAE

An V+/PI-	% de an V-/PI+	% de an V+/PI+	% de an V-/PI-	%
Tratamiento (ng/ml) LR	**UL**	**UR**	**LL**	
SK-MEL-2				
48 horas				
Sin tratamiento	1,23	1,23	94,37	3,16
CR011 (1000)	0,36	0,45	94,45	4,74
IgG2-vcMMAE (1000)	0,17	0,51	95,93	3,39
CR011-vcMMAE (100)	0,30	0,40	89,93	9,37
CR011-vcMMAE (1000)	2,08	2,02	82,08	13,83
TK-10				
48 horas				
Sin tratamiento	0,54	0,66	96,92	1,87
CR011 (1000)	0,83	0,34	98,27	0,55
IgG2-vcMMAE (1000)	0,62	0,95	97,09	1,33
CR011-vcMMAE (100)	0,71	0,57	97,72	1,00
CR011-vcMMAE (1000)	0,86	0,83	97,75	0,56

El análisis de apoptosis se llevó a cabo por citometría de flujo y los porcentajes de células en los cuadrantes UL (superior izquierdo), UR (superior derecho), LL (inferior izquierdo) y LR (inferior derecho) se determinaron por el software CellQuest (Becton Dickinson). An V: anexina V-FITC y PI: yoduro de propidio.

Además, un aumento en las células teñidas dualmente (anexina V+/PI+) tras el tratamiento con CR011-vcMMAE indicó que el inmunoconjugado de CR011 potenció la muerte celular. Estos resultados sugieren juntos que CR011-vcMMAE indujo selectivamente la detención del ciclo celular de G2/M seguido de muerte celular apoptósica.

Ejemplo 26: CR011: Una IgG1 completamente humana pura para uso en terapia de melanoma explotando el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se generaron anticuerpos monoclonales completamente humanos (mAb)-IgG2 para CG56972/GPNMB, un antígeno encontrado predominantemente sobre la superficie de melanoma y células tumorales de cerebro. El mAb IgG2 de CR011 desnudo (mAb 1.15) no tuvo efecto sobre células que expresan CG56972 tanto in vitro como in vivo. Por tanto, los inventores examinaron si el cambio de isotipo de una IgG2 a una IgG1 podría permitir que el mAb destruyera células de melanoma humano mediante funciones efectoras de ADCC.

Brevemente, para cambiar CR011 de un anticuerpo de IgG2 a IgG1 se sintetizó la región constante que codifica el ADN bicatenario de IgG1 (alotipo Gm(f)) y la región constante de IgG2 se sustituyó por la región constante de IgG1 usando la solución de PCR por solapamiento. Las secuencias se describen a continuación:

Cadena pesada madura del mAb CR011 1.15.1 (IgG2)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSG
STYSNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKT
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 394)

Cadena pesada madura del mAb CR011 1.15.1 (IgG1)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYIYYSG
STYSNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 395)

Los inventores analizaron primero las propiedades de unión de los anticuerpos monoclonales IgG1 e IgG2 completamente humanos sobre células de melanoma SK-MEL-2 que se ha mostrado que expresan CG56972 sobre la superficie celular y se unen a la IgG2 de CR011. Como se muestra en la Figura 11, tanto los mAb IgG1 como IgG2 produjeron desplazamientos de FACS comparables en las células SK-MEL-2 en comparación con mAb de control de isotipo (Figura 11), que indica que ambos isotipos se unen a CG56972/GPNMB con densidades y afinidades de saturación comparables.

A continuación, los inventores examinaron si el mAb IgG1 de CR011 podría inducir ADCC en células SK-MEL-2 en cultivo en presencia de PBMC humano. Se aislaron PBMC humanas de sangre completa usando una placa de Ficoll. Brevemente, en un tubo de 50 mL se añadieron 15 mL de PBS a 20 mL de sangre completa que estaba debajo de 10 mL de placa de Ficoll y el tubo se centrifugó a 2000 rpm. Las células mononucleares se recogieron de la interfase y se lavaron 3 veces con PBS. El ensayo de ADCC se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos usando un ensayo de fluorescencia para citólisis de Perkin-Elmer (ensayo citotóxico DELFIA EuTDA). El procedimiento se basa en cargar células diana con un ligando potenciador de la fluorescencia (BATDA, dicarboxilato de bis(acetoximetil)terpiridina). El ligando hidrófilo penetra rápidamente en la membrana. Dentro de la célula, los enlaces éster se hidrolizan para formar un ligando hidrófilo (TDA, ácido dicarboxílico de terpiridina) que ya no puede pasar a través de la membrana. Después de la citólisis, el ligando es liberado y se introduce a la disolución de europio. El europio y el ligando forman un quelato altamente fluorescente y estable (EuTDA). La intensidad de fluorescencia se registra usando longitudes de onda de excitación y de emisión como λex = 340 nm y λem = 613 nm, respectivamente.

La citotoxidad mediada por células dependientes de anticuerpos sobre células SK-MEL-2 se ensayó en presencia de PBMC y anticuerpo monoclonal CR011 usando relaciones de efector:diana de 10, 30, 60 y 100 y diversas concentraciones de mAb IgG1 o IgG2 contra CG56972/GPNMB (2, 5, 10 µg/200 µl). Los datos de los inventores mostraron que entre 30 y 100 veces de PBMC, el mAb IgG1 produjo la citólisis de células SK-MEL-2 en un modo dependiente de la dosis (Figura 12A), mientras que mAb IgG2 no mostró ninguna citólisis (Figura 12B). Por tanto, los inventores concluyeron que el mAb IgG1 de CR011 para CG56972/GPNMB puede destruir células de melanoma que expresan CG56972/GPNMB in vitro y posiblemente melanoma humano in vivo mediante funciones efectoras de ADCC. El mAb IgG1 de CR011 también puede ser útil en combinación con citocinas efectoras inmunitarias que podrían proporcionar algún beneficio clínico en melanoma metastásico tal como alta dosis de IL-2, interferón gamma o TNF-alfa. También puede usarse CR011 para tratar melanoma en combinación con inmunoterapia con vacuna,

inmunomoduladores tales como MDX-010, radioterapia y/o quimioterapia.

Ejemplo 27: Tratamiento de astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma y otros tumores del SNC

El astrocitoma/glioblastoma es una neoplasia altamente resistente a fármacos que representa necesidades médicas significativas sin satisfacer. Los investigadores identificaron CG56972 como gen humano (también conocido como GPNMB) que se expresa altamente en estos tejidos de cáncer y líneas de células cancerosas humanos. La GPNMB es una proteína transmembrana de tipo I que posiblemente participa en el tráfico vesicular con un patrón de expresión muy limitado en el cerebro humano. Los inventores generaron anticuerpos monoclonales completamente humanos contra CG56972, el dominio extracelular de GPNMB (SEQ ID NO:289). El anticuerpo monoclonal guía de los inventores, designado CR011-vcMMAE, se caracterizó bioquímicamente y se probó para la actividad terapéutica contra líneas celulares derivadas de tumores de cerebro humano de astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma u origen neuroectodérmico.

El análisis de la expresión de transcritos demostró ARNm de GPNMB altamente elevado en tumores de cerebro derivados de astrocitoma, glioblastomas, meduloblastoma y tumores de origen neuroectodérmico con una expresión baja limitada en el cerebro normal. CR011 se unió por análisis por FACS a GPNMB superficial sobre líneas de células de cáncer de cerebro. Los mAb CR011 transfirieron por Western los productos génicos de 100 y 120 kDa predichos. Los ensayos clonogénicos demostraron que los mAb de CR011-vcMMAE inhibieron el crecimiento de líneas de células de cáncer de cerebro.

Material y procedimientos:

Líneas celulares y condiciones de cultivo: Todas las líneas celulares humanas, SK-MEL-2, XF-498, SNB-78, U-118-MG, SF-539, H79MG, D392-MG, D534-MG, SK-N-SH, U-251, SF-295, D450-MG, U87MG, SF-268, T98G y SW-1783 se obtuvieron de la Colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA) o se compraron de NCI (Bethesda, MD). Las células se mantuvieron en DMEM o RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía SBF al 10% (Gemini Bio-Products, Woodland, CA) y penicilina-estreptomicina.

PCR cuantitativa en tiempo real (RTQ-PCR): Se aisló ARN total usando el kit RNeasy con una etapa de digestión con ADNsa (Qiagen Inc., Valencia). Las muestras de ARN se derivaron de tejidos humanos normales obtenidos comercialmente (Clontech, Palo Alto, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA) o líneas celulares cultivadas según especificaciones. Se recogieron ARN y se realizó PCR como se ha descrito previamente (Shimkets RA y col. Nat Biotechnol., 1999. 17-8: 798-803) usando reactivos TaqMan® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los ARN se normalizaron utilizando β-actina humana y sondas TaqMan® de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) según las instrucciones del fabricante. Se usaron cantidades iguales de ARN normalizado como moldes en reacciones de PCR con reactivos específicos de GPNMB para obtener valores de ciclo umbral (CT). Para la representación gráfica, los números de CT se convirtieron en expresión relativa con respecto a la muestra que presentaba el mayor nivel de expresión. El análisis de RTQ-PCR se realizó con un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 usando reactivos TaqMan (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Se usaron los siguientes cebadores (5'-3'):

Directo-TCAATGGAACCTTCAGCCTTA (SEQ ID NO: 338)

Inverso-GAAGGGGTGGGTTTTGAAG (SEQ ID NO: 339)

Sonda-TET-CTCACTGTGAAAGCTGCAGCACCAG-TAMRA (SEQ ID NO: 340)

CuraChip™: Se lisaron tejidos en trizol. Se preparó ADNc marcado con biotina usando 15 mg de ARN total con cebadores poli(T). La expresión génica se evaluó por hibridación a la micromatriz CuraChip patentada (CuraGen, New Haven, CT) de 11.000 sondas de oligonucleótidos. Se hibridaron portaobjetos durante 15 h a 30ºC con rotación constante, se lavaron durante 30 min a temperatura ambiente (TA), se incubaron en disolución de estreptavidina (4ºC, 30 min), se lavaron tres veces durante 15 min a TA, se incubaron en tampón de detección conjugado con Cy3 (4ºC, 30 min) y se lavaron tres veces durante 15 min a TA. Los portaobjetos se cribaron (GMS 418 Scanner, Genetic Microsystems, Woburn, MA) y se analizaron usando el software IMAGENE (BioDiscovery, Marina del Rey, CA). Los datos se sometieron a normalización al centil 90 y la expresión del gen GPNMB se analizó en comparación con la del gen de mantenimiento GAPDH. La secuencia de oligonucleótidos usada para detectar GPNMB es 5'-TGATCAGTAAGGATTTCACCTCTGTTTGTA (SEQ ID NO: 341). La secuencia de oligonucleótidos usada para detectar GAPDH es 5'-ACCTTGTCATGTACCATCAATAAAGTACCC (SEQ ID NO: 342), correspondiente a los pb 1243-1272 del transcrito de GAPDH (nº de registro NM_002046).

Citometría de flujo: El análisis cuantitativo de la expresión de GPNMB sobre la superficie de líneas celulares se determinó por citometría de flujo (FACS). Se recogieron aproximadamente 1 x 106 células, se lavaron y se incubaron con una cantidad saturante (10 µg/mL) de o CR011 o anticuerpo de control del mismo isotipo en tampón de tinción que contenía PBS (pH 7,4), SBF al 4% y NaN3 al 0,1% durante 30 min sobre hielo, seguido de lavado y tinción con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) a 1:100 durante 30 min sobre hielo. Las células se fijaron en paraformaldehído al 1%/PBS y se examinaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur. El análisis de datos se realizó con el

software Becton Dickinson Cell Quest versión 3.3 y la relación de la intensidad de fluorescencia media geométrica (GMR) se determinó para cada tipo de célula.

Análisis de inmunotransferencia: Se recogieron células SK-MEL-2, XF-498, SNB-78, U-118-MG, SF-539, H79MG, D392-MG, D534-MG, SK-N-SH, U-251, SF-295, D450-MG, U87MG, SF-268, T98G y SW-1783 y se lisaron sobre hielo durante 30 min en tampón de lisis que contenía NP-40 al 1%, NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,02 M, glicerina al 10%, EDTA 0,01 M y mezcla completa de inhibidor de proteasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Los sobrenadantes se recogieron y la concentración de proteína se determinó con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). Para el análisis de inmunotransferencia, 40 ul de lisado de células totales de un pocillo de células confluentes recogidos de una placa de cultivo de tejido Falcon de 6 pocillos se hirvieron en tampón de muestra de Laemmli, se centrifugaron y se resolvieron bajo condición reductora en geles de Tris-glicina al 4-20% (Invitrogen). Los geles se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF de 0,45 µm (Invitrogen). Las membranas se bloquearon con BSA al 3% (Sigma, St. Louis, MO) en TBST durante 3 h y se sondaron con IgG policlonal de cabra dirigida contra GPNMB (R & D Systems; 1 µg/ml, total 10 µg)) durante 3 h. Se añadió anticuerpo secundario dirigido contra globulina de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Labs) y se incubó durante 30 min. Las membranas se lavaron en TBST y se sometieron a quimioluminiscencia potenciada (Amersham) siguiendo el protocolo del fabricante.

Ensayos clonogénicos: La actividad inhibitoria del crecimiento de CR011-vcMMAE se determinó mediante ensayo clonogénico. Se sembraron células en placas de 96 pocillos y se dejaron recubrir durante la noche. Se añadió CR011-vcMMAE o anticuerpo monoclonal del mismo isotipo a diversas concentraciones a cultivos celulares subconfluentes y se incubaron durante 4 días a 37ºC. Entonces, las células se transfirieron a placas 6 de pocillos y se dejó que formaran colonias. Las colonias se tiñeron con tinción Giemsa (Sigma) y se contaron. Las fracciones de células supervivientes se calcularon basándose en la relación de la muestra tratada y el control sin tratar. Los resultados se expresaron como un porcentaje de control usando el software GraphPad Prism versión 4. La CI50 se definió como la concentración que produce una reducción del 50% de la formación de colonias en comparación con cultivos de control sin tratar.

Resultados:

1. Expresión del transcrito de GPNMB en astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma y tumores humanos de origen neuroectodérmico.

Los inventores examinaron la expresión de transcritos de GPNMB en líneas de células y tejidos cancerosos humanos (Figuras 13 A y B). El análisis de expresión de transcritos de los inventores indicó que GPNMB se expresó fuertemente en todas (15/15) las líneas de células de cáncer de cerebro humano probadas (Figura 13A). Usando RTQ-PCR se encontró que GPNMB se expresaba en células de origen de glioblastoma/astrocitoma mixto, glioblastoma/gliomas, astrocitomas y neuroblastomas metastásicos. La mayoría de las líneas celulares de tumor de cerebro o del SNC mostraron un alto nivel expresión con CT< 27. Se encontró de importancia que GPNMB se expresa altamente (CT<27,0) en células XF-498, U-118-MG, SNB-78 y SF-539. Como se muestra en la Figura 13B, la GPNMB también se expresó a altos niveles en 4/5 biopsias de glioma humano y 1/4 biopsias de meduloblastoma humano. Usando análisis de micromatrices de un chip fabricado en casa que contenía un gran panel de genes humanos (Figura 13C) se encontró que la GPNMB se expresaba altamente en 5/9 cánceres de cerebro de origen de astrocitoma o glioblastoma, además de 4/9 oligodendrogliomas. El análisis de los inventores de estos perfiles de expresión tumoral mostró que el mensajero de GPNMB se detectó a un grado mucho menor en tejidos de cerebro normal. Estos datos también guardan relación con los datos inmunohistoquímicos de los inventores que demostraron la falta de tinción de CR011 en células de cerebro humano normales que incluyen neuronas y células de la glía. Se considera en conjunto que estos datos demuestran que el transcrito de GPNMB se expresa a cantidades altamente elevadas en cáncer de cerebro y líneas celulares de oligodendroglioma y especímenes aislados de tumores humanos.

2. Generación de anticuerpos monoclonales CR011 completamente humanos para CG56972/GPNMB

Se predice que la proteína GPNMB es una glicoproteína transmembrana de tipo I. La expresión altamente elevada de transcritos de GPNMB y la posible localización en la superficie celular de esta proteína en muestras de cáncer humano animaron a los inventores a generar anticuerpos monoclonales (mAb) como un posible agente terapéutico del cáncer. Por tanto, los inventores clonaron el dominio extracelular de GPNMB humano (ECD; aa 23-480). La secuenciación del ADNc clonado reveló la presencia de una inserción de 36 nt en el marco, probablemente debido a un corte y empalme alternativo en el límite del exón 6/7, que añadió 12 aa adicionales (ATTLKSYDSNTP) (SEQ ID NO: 343) después del residuo 339 de la secuencia de proteínas de GPNMB publicada. Los inventores verificaron la autenticidad de la inserción de 36 nt mediante RT-PCR. El ADNc se expresó a continuación en células HEK293 humanas. La proteína resultante se recogió, se purificó a partir de los medios acondicionados y se usó como inmunógeno para generar mAb completamente humanos contra CG56972-ECD. Tras la inmunización de XenoMouse® se generaron mAb que reconocieron específicamente la proteína CG56972-ECD mediante ELISA. El mAb guía de los inventores, designado 1.15 o CR011 contra CG56972-ECD purificado, que presentó una Kd de 52 nM contra la proteína CG56972-ECD purificada, se seleccionó para una caracterización en profundidad y será el centro del resto de este ejemplo.

3. Detección por mAb CR011 1.15 de la expresión de la proteína GPNMB en cánceres de cerebro humano

Los inventores usaron adicionalmente anticuerpos monoclonales CR011 para examinar la expresión superficial de la proteína GPNMB en una variedad de líneas de células de cáncer de cerebro por citometría de flujo (Figura 14 y Tabla 54). Los análisis por FACS demostraron que las líneas de células de cáncer de cerebro XF-498, U-118-MG, SNB-78 y SF-539, todas positivas para la expresión del transcrito de GPNMB, mostraron tinción superficial con anticuerpos monoclonales CR011 de al menos 1,5 veces superior por encima del ruido del mAb de control de isotipo (Figura 14). La línea celular SF-268, que era la más débilmente positiva (CT>32) para la expresión del transcrito de GPNMB (Figura 13C y Tabla 54), mostró una tinción superficial mínima como era de esperar de aproximadamente 1,5 veces por encima del ruido del mAb de control. La línea celular de melanoma SK-MEL-2 de los inventores, que es el control positivo de los inventores para la expresión de GPNMB, mostró una fuerte tinción de la superficie celular.

Para investigar la expresión de la proteína GPNMB en el panel de los inventores de líneas de células de cáncer de cerebro, los lisados de células totales se recogieron, se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a filtros de membrana y se sometieron a análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal GPNMB. Como se muestra en la Figura 15, el anticuerpo policlonal GPNMB detectó dos especies de proteína que son productos de glicosilación diferentes de GPNMB de aproximadamente 100 y 120 kDa a partir de diversas líneas de células de cáncer de cerebro que se ha mostrado que expresan transcritos de GPNMB (Figura 13A). La proteína GPNMB se expresó altamente en células XF-498, SNB-78 y H79-MG y SF-539. Tanto las especies p100 y p120 se detectaron a un menor grado en U-118-MG, U251, D534-MG y D450-MG. Se detectaron pocas proteínas GPNMB o ninguna en la línea celular del transcrito GPNMB que expresa débilmente, SF-268. Un anticuerpo IgG2 de control del mismo isotipo no inmunoprecipitó GPNMB de ninguna de las líneas celulares examinadas. Todos estos datos guardan relación con la expresión en la superficie celular de la proteína GPNMB de los pesos moleculares predichos en cáncer de cerebro.

4. Inhibición del crecimiento in vitro de líneas celulares de astrocitoma/glioblastoma con CR011-vcMMAE.

La GPNMB posee un patrón de expresión en tejido humano muy limitado. En estudios preliminares, CR011 no inhibió el crecimiento de líneas de células cancerosas que expresaban GPNMB cuando se usó directamente (datos no mostrados). Como GPNMB es una molécula de la superficie celular en cánceres y melanoma de cerebro, y como CR011 se internalizó tras la incubación con células que expresan GPNMB, los inventores evaluaron si CR011 inhibiría el crecimiento de células cancerosas cuando se combinara con un anticuerpo secundario conjugado con inhibidores de la síntesis de proteínas (saporina). Los resultados de los inventores indicaron que CR011 podría inhibir específicamente el crecimiento de células cancerosas que expresaban GPNMB (datos no mostrados). Por tanto, los inventores conjugaron CR011 directamente con el fármaco citotóxico monometilaurostatina E (MMAE) mediante un enlazante de valina-citrulina (vc) escindible por proteasa altamente estable, pero intracelular. El conjugado de anticuerpo-fármaco resultante se llamó CR011-vcMMAE.

Para investigar si CR011-vcMMAE inhibió específicamente el crecimiento de células de cáncer de cerebro se realizaron ensayos clonogénicos para evaluar la viabilidad celular después del tratamiento con CR011-vcMMAE. Como se muestra en la Figura 16 y la Tabla 54, los resultados de los inventores indicaron que las células que expresaban GPNMB fueron sensibles a la inhibición del crecimiento producida por CR011-vvMMAE, pero no las células que expresaron escasamente este antígeno (véase SF-268 y LOXIMVI) a concentraciones de vcMMAE inferiores a 3 µg/mL. Sorprendentemente, CR011-vcMMAE poseyó CI50 de aproximadamente 215, 450, 1250 y 1050 ng/mL en células XF-498, SNB-78, U-118-MG y SF-539 (Figura 16 y Tabla 54). En estos experimentos, las CI50 guardaron relación con la densidad de la superficie celular como se mide por análisis por FACS. A diferencia, el anticuerpo IgG2 de control humano-vcMMAE fracasó al inhibir el crecimiento de cualquiera de las líneas celulares examinadas a concentraciones de hasta 3 µg/ml (Tabla 54) con CI50 que superaban 1,5 ó 4,5 µg/ml (Tabla 54).

Tabla 54. Resumen de RTQ-PCR, FACS e inhibición del crecimiento in vitro de líneas de células cancerosas humanas con mAb CR011

Línea celular	Descripción	Valores de CT	Veces de desplazamiento de CR011	CI50 de CR011-AE (ng/ml)	CI50 de IgG2-AE (ng/ml)
SK-MEL-2	Melanoma	ND	13,1, 21,4, 17,8	303	>1500
XF-498	Glioblastoma	+++	10, 9,5	216	>1500
SNB-78	Astrocitoma	+++	8,6	449	>1500
U-118-MG	Glioblastoma /astrocitoma	+++	7,4	1254	>1500
SF-539	Glioblastoma	+	5,4	1030	>4500
H79MG	Glioblastoma /astrocitoma	ND	4,7, 3,9	ND	ND
D392-MG	Glioblastoma	ND	3,1	ND	ND
D534-MG	Glioblastoma	ND	2,3	ND	ND
SK-N-SH	Neuroblastoma	+	2	ND	ND
U-251	Glioblastoma	+++	1,9	ND	ND
SF-295	Glioblastoma	++	1,8	ND	ND
D450-MG	Glioblastoma	ND	1,6	ND	ND
U87MG	Glioblastoma /astrocitoma	++	1,5	ND	ND
SF-268	Glioblastoma /astrocitoma	+	1,5	>1500	>4500
T98G	Glioblastoma	+	1,3	ND	ND
SW 1783	Astrocitoma	+	1,1	ND	ND

[a]CR011-vcMMAE (mAb 1.15): Los valores de CT se determinaron por RTQ-PCR como se describen en Materiales y procedimientos. Las relaciones de medias geométricas (GMR) se determinaron por análisis de citometría de flujo. La citotoxidad del anticuerpo-fármaco (ADC) o la destrucción de células se determinó por ensayo clonogénico como se ha descrito. [b]El valor de CI50 es la media y la DE de un ensayo clonogénico representativo con cada experimento realizado por triplicado pocillos. ND: No hecho.

Conclusión:

Estos datos indican que CR011-vcMMAE puede ser un agente altamente potente y selectivo para el tratamiento de astrocitoma/glioblastoma y sus metástasis, además de tumores de cerebro de meduloblastoma y de origen neuroectodérmico. CR011-vcMMAE también puede ser útil para el tratamiento de metástasis de melanoma de cerebro y otras neoplasias de cerebro tales como meningitis neoplásica.

Ejemplo 28: Anticuerpos manipulados genéticamente derivados de CR011

Los bi-scFv CR011 (véase la Figura 17) de este trabajo se diseñaron para unirse a un epítopo CD3 del receptor de células T en linfocitos T humanos citotóxicos y, al misma tiempo, para elegir como diana células enfermas que expresan GPNMB, con el resultado neto de facilitar la lisis o la destrucción de las células enfermas.

Los dominios V_L y V_H de mAb CR011, clon 1.15, se usaron en la construcción de 3 CR011 basados en anticuerpos manipulados genéticamente:

(1) Anticuerpo monocatenario CR011 (scFv CR011)

(2) anticuerpo monocatenario biespecífico (bi-scFv) CR011 x anti-CD3, conjunto de enlazantes L4-L2-L4

(3) anticuerpo monocatenario biespecífico (bi-scFv) CR011 x anti-CD3, conjunto de enlazantes L4-L4-L4

Los componentes de la proteína scFv CR011 fueron: péptido señal-V_L (CR011)-enlazante 4-V_H (CR011)-marca Flag. Los componentes de la proteína bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) fueron: péptido señal-V_L (CR011)-enlazante 4-V_H (CR011)-enlazante 2-V_H (anti-CD3)-enlazante 4-V_L (anti-CD3)-marca Flag. Los componentes de la proteína bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) fueron: péptido señal-V_L (CR011)-enlazante 4-V_H (CR011)-enlazante 4-V_H (anti-CD3)-enlazante 4-V_L (anti-CD3)-marca Flag.

Los diversos componentes de ADN expuestos resumidamente anteriormente se usaron para generar los tres productos de anticuerpos CR011 manipulados genéticamente . Los componentes de ADN se sintetizaron por Blue Heron y se clonaron en vectores de plásmido comercialmente disponibles mediante procedimientos familiares para aquellos expertos en la materia. Entonces, estos plásmidos se usaron en PCR para combinar los componentes indicados en los 3 ejemplos anteriores para generar inserciones de anticuerpos manipulados genéticamente para vectores de expresión. En los ejemplos de sistemas de expresión en huésped que ponen en práctica esta invención descritos más adelante, los inventores han usado células CHOK1 de mamífero para los vectores de expresión de CR011, pero la expresión no se limita a estas células; será reconocido por aquellos expertos en la materia que los anticuerpos CR011 manipulados genéticamente de esta invención pueden expresarse usando otros vectores, sistemas y células que incluyen, pero no se limitan a: vectores pET, promotores inducibles y constitutivos, y los huéspedes pueden incluir *E. coli*, especies de *Bacillus*, levadura que incluye *Pichia pastoris* o células de insecto. Otros huéspedes de expresión también pueden incluir diversas especies de plantas y animales transgénicos tales como cabras.

SP (péptido señal): Los inventores incorporaron un péptido señal en sus construcciones con el fin de expresar productos que serán secretados. El péptido señal que se utilizó para la expresión de células CHO se derivó de un péptido líder de la cadena ligera de inmunoglobulina (Jirik y col., 1986), o del anticuerpo CR002 (CuraGen).

Orden de los componentes de bi-scFv: El orden de los dominios variables de anticuerpos se fijó en ambas construcciones de bi-scFv del siguiente modo: V_L1-L-V_H1-L-V_H2-L-V_L2. Cada uno de los 4 dominios V estaba ligado por un segmento de enlazante, L. V_L1 y V_H1 representan los dominios variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, respectivamente, de CR011, y V_H2 y V_L2 representan los dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, respectivamente, de un anticuerpo dirigido contra CD3 que se usó para ambas construcciones de bi-scFv. También pueden usarse otros órdenes de los dominios V para los 2 componentes de scFv como se reconoce por aquellos expertos en la materia, y los productos evaluados para la actividad biológica.

Marca: Los inventores usaron la marca Flag de 8 aminoácidos en el extremo C de los anticuerpos CR011 manipulados genéticamente para facilitar la detección y purificación de los productos (Hickman y col., 2000).

scFv dirigido contra CD3: Las secuencias de los componentes de V*L* y V*H* del anticuerpo dirigido contra CD3 usado para generar los constructos de bi-scFv pueden encontrarse en la base de datos NCBI bajo el número de registro CAES5148 (Lutterbuese y col.)

Enlazantes usados en construcciones: La secuencia de L2, un enlazante corto de 5 aminoácidos que une los 2 componentes de scFv monoméricos juntos en bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) es G_4S (Mack y col., 1995). L4 es un enlazante de 25 aminoácidos basado en el enlazante 205C (Denzin y col., 1991): LSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDL (SEQ ID NO: 344) y se usa tanto en las especies de bi-scFv CR011 para ligar los V_L y V_H de CR011 como los V_H y V_L dirigidos contra CD3. En el caso del bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4), L4 también se usa para ligar los 2 componentes de scFv monoméricos juntos. Para el scFv CR011, el enlazante L4 se usó para ligar los dos dominios variables juntos.

1. Constructos de plásmidos de ADN para la expresión de especies de scFv CR011 y bi-scFv CR011 x anti-CD3

Marca Flag de scFv CR011: El producto de amplificación por PCR para generar la construcción de expresión para scFv CR011 se generó a partir de un molde de ADN sintético (Blue Heron) usando los cebadores F1/R1 seguido de PCR anidada con el par de cebadores F1 anidado/R1 (Tabla 55) y ADN polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, nº de cat. 600322) según las indicaciones del fabricante. Un fragmento de PCR Sal I/EcoR I que codificaba el casete de scFv CR011 se clonó en los sitios de restricción correspondientes del vector pCTN (CuraGen Corporation, vector de expresión de mamífero) usando el kit de ligadura de ADN Fast-Link (Epicentre, nº de cat. LK11025).

Tabla 55

Nombre	Secuencia
Cebador F1	5' – TCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAATAGTGATGACGCA GTC (SEQ ID NO: 345)
Cebador R1	5' – CCGGAATTCTTACTATTTGTCATCATCGTCCTTATAATCGCTAGCTGAGGAGACGGT (SEQ ID NO: 346)
Cebador anidado F1	5' – ACGCGTCGACCCACCATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGG CTC (SEQ ID NO: 347)
Cebador F2	5' – TCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAATAGTGATGACGCA GTC (SEQ ID NO: 348)
Cebador R2	5' – CCGGAATTCTTACTATTTGTCATCATCGTCCTTATAATCGCTAGCTTTCAGCTCCAG (SEQ ID NO: 349)
Cebador anidado F2	5' – ACGCGTCGACCCACCATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGG CTC (SEQ ID NO: 350)
Cebador F3	5' – ACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACC (SEQ ID NO: 351)
Cebador R3	5' – CCGCTCGAGCTATTTGTCATCATCGTCCTTATAATCTTTCAGCTCCAGCTT (SEQ ID NO: 352)
Cebador anidado F3	5' – TCTTCGCGACCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 353)

Marca Flag del conjunto de enlazantes (L4-L2-L4) de bi-scFv CR011 x anti-CD3: El producto de amplificación por PCR para el bi-scFv CR011 x anti-CD3 que tiene el conjunto de enlazantes (L4-L2-L4) se generó a partir de un molde de ADN sintético (Blue Heron) usando los cebadores F2/ R2 seguido de PCR anidada con el par de cebadores F2 anidado/R2 (véase la Tabla 55 para las secuencias de oligonucleótidos) y ADN polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, nº de cat. 600322) según las indicaciones del fabricante. El fragmento de PCR Sal I/EcoR I que tiene la secuencia codificante para bi-scFv CR011 x anti-CD3 (L4-L2-L4) se clonó en los sitios correspondientes del vector pCTN usando el kit de ligadura de ADN Fast-Link (Epicentre, nº de cat. LK11025).

Marca Flag del conjunto de enlazantes (L4-L4-L4) de bi-scFv CR011 x anti-CD3: El producto de amplificación por PCR para bi-scFv CR011 x anti-CD3 que tiene el conjunto de enlazantes (L4-L4-L4) se generó a partir de un molde de ADN sintético (Blue Heron) usando los cebadores F3/R3 seguido de PCR anidada con el par de cebadores F3 anidado/R3 (Tabla 55) y ADN polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, nº de cat. 600322) según las indicaciones del fabricante. El fragmento de PCR Nru I/Xho I que tiene la secuencia codificante para bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) se clonó en los sitios correspondientes del vector de expresión pEE14.4FL2 (Lonza Biologics plc, 228 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 4Dx, UK) usando el kit de ligadura de ADN Fast-Link (Epicentre, nº de cat. LK11025).

Las secuencias de ADN de las 3 insercciones de las construcciones de expresión anteriores se verificaron por secuenciación de ambas cadenas de los productos de ADN relevantes.

2. Producción de proteína de los anticuerpos CR011 manipulados genéticamente en células CHOK1

Se cultivaron células de ovario de hámster chino adherentes (CHOK1) (nº de catálogo de ATCC CCL-61) en medio DMEM (Invitrogen, nº de cat. 10564-011) complementado con suero bovino fetal al 10% (Gemini, nº de cat. 100106), complemento de GS (JRH Biosciences, nº de cat. 58672-100M) y 50 mg/l de gentamicina (Invitrogen, nº de cat. 15750078).

Las células CHOK1 se transfectaron con reactivo FuGENE 6 (Roche, nº de cat. 1815075) según las indicaciones del fabricante. La expresión y secreción se verificó por transferencia de Western realizada aproximadamente 48 horas después de las transfecciones. La selección de líneas de scFv CR011 y bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) secretadas estables se realizó en medio de selección A (Tabla 56), mientras que la selección de una línea de bi-scFv CR011 x anti-CD3 secretada estable (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) se realizó en medio de selección B (Tabla 57).

Tabla 56

Medio de selección A de CHOK1 (Adherente)	Vendedor	Nº de producto	Descripción
Libre de DMEM-glutamina	JRH Biosciences	51435-1000M	Medio libre de glutamina para GS SystemTM (DMEM/altamente modificado)
SBF dializado al 10% (inactivado por calor a 56ºC durante 30 minutos)	JRH Biosciences	12117-500M	Suero bovino fetal, dializado (500 ml)
1X complemento de GS	JRH Biosciences	58672-100M	Complemento de GS (50X)
50 mg/L de gentamicina	Invitrogen	15750078	Disolución de reactivo de gentamicina (50 mg/ml), líquido
1 mg/mL de G418	Invitrogen	10131027	Geneticina (G418)

Tabla 57

Medio de selección B de CHOK1 (Adherente)	Vendedor	Nº de producto	Descripción
Libre de DMEM-glutamina	JRH Biosciences	51435-1000M	Medio libre de glutamina para GS SystemTM (DMEM/altamente modificado)
SBF dializado al 10% (inactivado por calor a 56ºC durante 30 minutos)	JRH Biosciences	12117-500M	Suero bovino fetal, dializado (500 ml)
1X complemento de GS	JRH Biosciences	58672-100M	Complemento de GS (50X)
50 mg/L de gentamicina	Invitrogen	15750078	Disolución de reactivo de gentamicina (50 mg/ml), líquido
MSX 25 µM	Sigma	M 5379	Sulfoximina de L-metionina (MSX)

En cada caso, 8 de 96 clones de CHOK1 de scFv CR011 y bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) que estuvieron secretando productos se expandieron y se archivaron. Los mejores clones estables que secretaban productos en cada caso se adaptaron al cultivo en suspensión en matraces oscilantes con medio de selección C (Tabla 58) a 37ºC y 5% de CO_2. La producción de proteína para scFv GR011 y bi-scFv CR011 x CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) se llevó a cabo en 4 L de medio de selección D (Tabla 59) a 30ºC y 5% de CO_2.

Tabla 58

Medio de selección C (suspensión) a gran escala de CHOK1	Vendedor	Número de producto	Descripción
Ex-Cell 302	JRH Biosciences	14324-1000M	Medio libre de suero Ex-Cell 302 CHO sin L-glutamina (1000 mL)
SBF al 5%	JRH Biosciences	12117-500M	Suero bovino fetal, dializado (500 mL)
Complemento de GS	JRH Biosciences	58672-100M	Complemento de GS (50X)
Complemento de HT	Invitrogen	11067030	Complemento de HT (100X)
1 mg/mL de G418	Invitrogen	10131027	Geneticina (G418)

Tabla 59

Medio de selección C (suspensión) a gran escala de CHOK1	Vendedor	Número de producto	Descripción
Ex-Cell 302 + Ex-Gell CD CHO (1:1)	JRH Biosciences	14324-1000M	Medio libre de suero Ex-Cell 302 CHO sin L-glutamina (1000 mL)
	JRH Biosciences	14360-1000M	Medio CD CHO (1000 mL)
SBF al 5%	JRH Biosciences	12117-500M	Suero bovino fetal, dializado (500 mL)
Complemento de GS	JRH Biosciences	58672-100M	Complemento de GS (50X)
Complemento de HT	Invitrogen	11067030	Complemento de HT (100X)
1 mg/mL de G418	Invitrogen	10131027	Geneticina (G418)

Sólo se encontró uno de doscientos clones de CHOK1 de bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) para producir un producto secretado; este clon se expandió y se archivó. La producción de proteína para el clon CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) se llevó a cabo usando un aparato de fabricación de células (Nunc, nº de cat. 164327) en medio de selección B (Tabla 57), butirato de sodio 1 mM (Sigma, nº de cat. B5887) a 37ºC y 10% de CO_2.

3. Purificación de proteína de los anticuerpos manipulados CR011

La purificación de proteína para Flag de scFv CR011 y Flag de bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) se llevó a cabo en tres etapas de cromatografía que incluían cromatografías de afinidad, intercambio iónico y por exclusión de tamaño. Para la purificación de proteína de Flag de bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) se usaron cromatografías de afinidad y por exclusión de tamaño.

La cromatografía de afinidad se realizó usando gel de afinidad anti-FLAG M2 (Sigma, nº de cat. A2220-25 ml) según las instrucciones del fabricante en un instrumento BioCAD 700E (Applied Biosystems). La cromatografía de intercambio iónico se realizó en una columna MonoQ 5/50 GL (Amersham, nº de cat. 17-5166-01) usando Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 como tampón de equilibrio y una elución en gradiente con NaCl 0-1 M. La cromatografía por exclusión de tamaño se realizó usando una columna Superdex 75/10/300 GL (Amersham, nº de cat. 17-5174-01) siguiendo los protocolos del fabricante en el instrumento de cromatografía líquida BioCAD 700E (Applied Biosystems).

Los rendimientos aproximados de 1 l de medio de CHOK1 acondicionado fueron:

(1) scFv CR011: 1,0 mg

(2) bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4): 0,5 mg

(3) bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4): 1,5 mg

La secuencia de aminoácidos del extremo N de las proteínas purificadas se determinó por degradación de

Edman usando procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. La secuencia de los cinco primeros aminoácidos era: E I V M T en cada caso (el extremo N maduro de la proteína VL CR011), que indica que se había producido un procesamiento preciso por la peptidasa señal para dar un producto secretado soluble de la secuencia y tamaño predichos.

El ADN y las secuencias de aminoácidos de los 3 productos de CR011 manipulados se facilitan más adelante.

SEQ ID para scFv CR011 - (V_L-L4-V_H) Flag. Se usó el péptido señal de la cadena ligera kappa humana como se describe en Kabat y col. 45 CLL-CL). Había una marca FLAG incluida en el extremo C. La secuencia de Kozak CCACC se incluyó en el cebador de PCR en 5'.

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAAT
AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA
GGGCCAGTCAGAGTGTTGACAACAACTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC
AGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACTTTC
CGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAA
GGACCTGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAC
CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACC
CGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTG
AGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACTACTT
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGATTATAAGGACGATGAT
GACAAATAGTAA (SEQ ID NO: 354)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLL
IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKLSADDAK
KDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLE
WIGYIYYSGSTYSNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGTLV
TVSSASDYKDDDDK (SEQ ID NO: 355)

SEQ ID para bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) - Se usó el péptido señal de la cadena ligera kappa humana como se describe en Kabat y col. 45 CLL-CL). Había una marca FLAG incluida en el extremo C.

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGTGAAAT
AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA
GGGCCAGTCAGAGTGTTGACAACAACTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC
AGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACTTTC
CGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAA
GGACCTGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAC
CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACC
CGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTG
AGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACTACTT
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGATATCAAA
CTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTT
CTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGA
ATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGG
CCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGA
GGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCC
AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAA
AGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGGACATTCAGCTGACCCAGTCTCCAGCA
ATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTT
ACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAA
AGTGGCTTCTGGAGTCCCTTATCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAA
TCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCT
CACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTAGCGATTATAAGGACGATGATGACAAA
TAGTAA (SEQ ID NO: 356)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLL
IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKLSADDAK
KDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLE
WIGYIYYSGSTYSNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGTLV
TVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGY
TNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSLSAD
DAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPK
RWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKASDYK
DDDDK (SEQ ID NO: 357)

SEQ ID para bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) - Se usó el péptido señal de CR002. Había una marca FLAG incluida en el extremo C.

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAAT
AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA
GGGCCAGTCAGAGTGTTGACAACAACTTAGTCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC
AGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACTTTC
CGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAA
GGACCTGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTTTTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAC
CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTCCAACC
CGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGACGCTG
AGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATAACTGGAACTACTT
TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCATTATCAGCGGATGACGCCAAGAAA
GACGCAGCCAAAAAGGACGATGCAAAGAAGGATGACGCAAAGAAAGATTTAGATATCAAACTG
CAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTTCTG
GCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATG
GATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCA
CATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGA
CTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCACTTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAAAGA
TGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGGACATTCAGCTGACCCAGTCTCCAGCAATC
ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACA
TGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGT
GGCTTCTGGAGTCCCTTATCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCA
GCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTCAC
GTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGATTATAAGGACGATGATGACAAATAGCTCGAG
CGG (SEQ ID NO: 358)

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDNNLVWYQQKPGQAPRLLIY
GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIKLSADDAKKDA
AKKDDAKKDDAKKDLQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKGLEWIGYI
YYSGSTYSNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARGYNWNYFDYWGQGTLVTVSSLS
ADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPG
QGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYW
GQGTTLTVSSLSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYM
NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAG
TKLELKDYKDDDDK (SEQ ID NO: 359)

4. Ensayo de los 3 anticuerpos manipulados CR011 por ELISA, citometría de flujo y determinación de la citotoxicidad:

ELISA: La unión de los anticuerpos CR011 manipulados genéticamente a GPNMB recombinante purificado (2 µg/mL) se midió usando placas recubiertas durante la noche a 4ºC. Entonces, las placas se bloquearon y se lavaron. Se añadieron diversas diluciones de los anticuerpos CR011 manipulados genéticamente a los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 h y se lavaron. Se añadió mAb dirigido contra FLAG M2 conjugado con HRP (Sigma, St. Louis, MO) a los pocillos durante 1 h, se lavaron y la reacción se reveló con el reactivo de sustrato TMB como se describe por el fabricante (Pharmingen, San Jose, CA).

La unión del producto de scFv CR011 y bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) a GPNMB se confirmó primero usando ELISA como se muestra en la Figura 18. Las placas se recubrieron con proteína GPNMB humana marcada con His y V5. Las placas recubiertas se incubaron con tanto sobrenadantes que contenían bi-scFv CR011 x anti-CD3 como monómero de scFv CR011 purificado. La unión de los mAb recombinantes (tanto monómero como dímero) se detectó usando mAb dirigido contra FLAG M2 conjugado con HRP (Sigma). Como puede

verse en la Figura 18, ambas especies de anticuerpo dirigido contra GPNMB descritas se unen a la proteína GPNMB recombinante que indica que se conservó la especificidad y la actividad de unión del anticuerpo dirigido contra GPNMB manipulado usando los procedimientos descritos en este ejemplo.

Citometría de flujo: La unión de los anticuerpos CR011 manipulados genéticamente a proteínas nativas se analizó por FACS. Brevemente, células T y células SK-MEL-5 humanas se incubaron con tanto scFv CR011 como bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) (5 µg/muestra/100 µl) con posterior tinción con mAb anti-FLAG de ratón (Sigma) y F(ab')2 de Ig anti-ratón de cabra conjugado con PE. (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se recogieron diez mil acontecimientos y se analizaron en un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Para confirmar la unión de productos de scFv CR011 y bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) a la proteína GPNMB nativa expresada sobre la superficie celular, los inventores usaron células SK-MEL-5 que expresaban naturalmente GPNMB. Para verificar la unión del bi-scFv a moléculas CD3 humanas, los inventores usaron células T humanas purificadas. Como control positivo los inventores usaron mAb dirigido contra CD3-PE nativo y CR011 conjugado con PE. La unión de scFv CR011 se detectó usando mAb dirigido contra FLAG M2 con posterior tinción con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugada con PE, mientras que para la detección de la unión de mAb CR011 los inventores usaron anticuerpo dirigido contra IgG-PE humana. El mAb dirigido contra CD3 de control se unió a células T y el mAb dirigido contra GPNMB de control se unió a células de tumor SK-MEL-5. Los inventores encontraron que sólo bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) tiñó células T; el monómero de scFv CR011 no se unió a células T positivas para CD3 como era de esperar (véase la Figura 19). La unión a células SK-MEL-5 por tanto el monómero de scFv CR011 como por bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) estuvo presente a un bajo nivel (Figura 19).

Citotoxicidad: La capacidad de bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) para redirigir linfocitos T humanos para destruir células tumorales humanas pertinentes se midió por citometría de flujo. Las células tumorales se marcaron con el kit de enlazante fluorescente verde PKH2 (Sigma) y se lavaron. Las células T purificadas se cultivaron durante la noche con células tumorales marcadas con PKH2 en presencia o ausencia de bi-scFv purificado. La muerte de células tumorales positivas para GPNMB se midió por incorporación de yoduro de propidio (PI).

Para evaluar la capacidad del producto de bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) para aumentar la destrucción mediada por células T de células positivas para GPNMB los inventores realizaron una prueba citotóxica. Las células T purificadas se cultivaron durante la noche con células tumorales SK-MEL-5 marcadas con PKH2 (positivas para GPNMB) en presencia de diversas dosis de productos de scFv CR011 y bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) purificados.

Conclusión:

Bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) aumentó significativamente la destrucción de las células tumorales SK-MEL-5 por linfocitos T (Figura 20). A diferencia, la adición de scFv dirigido contra GPNMB monoespecífico no aumentó la destrucción de tumores SK-MEL-5. Además, no se observó citotoxicidad cuando las células tumorales se cultivaron con bi-scfv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) sin linfocitos T (Figura 20). Estos datos indican que bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) proporcionó suficiente unión mediante puentes entre células T y células SK-MEL-5 para inducir muerte celular y que ambos componentes de este anticuerpo biespecífico CR011 manipulado fueran biológicamente activos. Por tanto, el anticuerpo bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) manipulado genéticamente de la presente invención puede usarse como agente terapéutico para tratar enfermedades tales como melanoma y otros cánceres en los que niveles de GPNMB y células T presentes están regulados por incremento.

Pueden usarse otros procedimientos de análisis de citotoxicidad que incluyen fluorescencia y ensayo de liberación de cromo para demostrar la utilidad de bi-scFv CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L2-L4) en el tratamiento de tumores. También pueden usarse otros enlazantes para unir los dos componentes de monómero de scFv, como en la molécula CR011 x anti-CD3 (conjunto de enlazantes L4-L4-L4) descrita anteriormente.

Ejemplo 29: Procedimiento de producción optimizado de CR011-vcMMAE

CR011-AE es un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo dirigido contra GPNMB (CG56972) completamente humano CR011 conjugado con la toxina auristatina E mediante un enlazante escindible de proteasa. La relación de toxina respecto a anticuerpo es aproximadamente 4,0, pero puede variar entre 3,5 y 4,2. Por tanto, mientras que el anticuerpo GR011 sea IgG2 es posible agregar hasta 12 moléculas de toxina por molécula de anticuerpo usando los tioles libres como sitio reactivo.

La estructura de maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil-auristatina E (vcMMAE) se muestra en la Figura 21.

Conjugación: Un procedimiento de generación del principio activo que está constituido por el mAb CR011 unido a vcMMAE. Una visión general del procedimiento de conjugación se resume en la Figura 22.

Brevemente, el procedimiento de conjugación del anticuerpo CR011 completamente humano está constituido

por las 4 siguientes etapas. 1) Intercambio de tampón y eliminación de sacarosa por diafiltración, 2) reducción de disulfuros, 3) conjugación a vcMMAE y finalmente, 4) purificación de CR011-vcMMAE conjugado por diafiltración. Hay varios ensayos en todo el procedimiento, es decir, ensayos en el procedimiento que incluyen ensayo de Ellman y determinación de la concentración de proteína. Al final del procedimiento, el principio activo, es decir, el conjugado, se analiza para la relación de fármaco con respecto a anticuerpo, contenido de fármaco libre y concentración de proteína.

Diafiltración del anticuerpo en bloque: El anticuerpo en bloque originalmente formulado en fosfato a pH 7 - sacarosa al 10% se cambió de tampón en el tampón de conjugación (borato a pH 9,0 - NaCl) por diafiltración durante 10 diavolúmenes. Al final de la diafiltración, CR011 se diluyó a ~5,5 mg/mL y se filtró a través de un conjunto de dos filtros que estaban constituidos por 1,2 y 0,22 µm. El cambio de tampón se requiere debido a que la sacarosa interfiere con la reducción. Además, un pH alto mejora la solubilidad de CR011.

Reducción de CR011 - Consideraciones generales: CR011 se produce como un producto de isotipo IgG2 y contiene 6 puentes disulfuro en la región bisagra. Estos disulfuros pueden reducirse bajo condiciones suaves para dar lugar a 12 residuos de cisteína. Por tanto, es posible unir como máximo 12 moléculas de fármaco vcMMAE por anticuerpo. Para el procedimiento, sin embargo, el anticuerpo en bloque sólo puede reducirse parcialmente debido a que el objetivo es generar conjugados con un promedio de 4 moléculas de vcMMAE. El motivo de esto es doble. Primero, amplía la ventana terapéutica disminuyendo la posible toxicidad sistémica asociada a MMAE. Segundo, es difícil y algunas veces imposible producir conjugados completamente cargados con baja agregación debido a la solubilidad enormemente reducida conferida por el fármaco hidrófobo.

Procedimiento: Se añadió tris-(carboxietil)-fosfina o TCEP en la relación molar 4:1 (TCEP:mAb) a CR011 a una concentración de ~5,5 mg/ml en el reactor de doble pared equipado con un conjunto de agitador a 90 rpm. La reacción se dejó avanzar durante 3 horas a 37ºC en presencia de EDTA 1 mM. Al final se usó el ensayo de Ellman para determinar la cantidad de tioles libres. Normalmente eran 4,2 tioles por anticuerpo. Entonces, el reactor se enfrió hasta 4ºC.

Conjugación de CR011 - Consideraciones generales: La TCEP no se consumió completamente durante la reducción. La TCEP sobrante pudo reaccionar con vcMMAE. Sin embargo, esta reacción secundaria falsa fue más lenta en comparación con la reacción de conjugación y puede mitigarse añadiendo un exceso de vcMMAE. La ventaja de TCEP en comparación con DTT es que no requiere la eliminación del agente reductor sobrante.

Procedimiento: vcMMAE se disolvió en DMSO y se añadió un exceso molar del 20% al mAb CR011 reducido. La reacción se dejó avanzar durante 1 hora. La concentración final de DMSO es 4% (v/v). El DMSO desempeñó un fin dual en el procedimiento. Se requiere para solubilizar el fármaco y ayuda a solubilizar el conjugado. Al final de la conjugación se añadió N-acetilcisteína para extinguir cualquier fármaco sin reaccionar.

Purificación de CR011-vcMMAE: La temperatura en el reactor se llevó hasta temperatura ambiente. Se usó una disolución madre de sacarosa al 40% para ajustar la concentración de sacarosa final al 10% (peso/volumen) seguido de un ajuste de pH usando tampón histidina 300 mM-HCl a pH 5,0 hasta un pH final de 6,0. Entonces, el conjugado se purificó por diafiltración en tampón histidina 20 mM a pH 6,0-sacarosa al 10% (peso/volumen) y usando 10 diavolúmenes. Al final de la diafiltración, el conjugado se concentró a ~7 mg/mL y se filtró a través de un conjunto de tres filtros constituidos por 1,2, 0,45 y finalmente 0,22 µm.

Formulación de CR011-vcMMAE: El conjugado se formuló añadiendo Tween 20 a una concentración final del 0,02% y diluyendo hasta 6 mg/mL (±10%) usando tampón de formulación (histidina 20 mM a pH 6,0, sacarosa al 10%, Tween 20 al 0,02%). Entonces, el conjugado se almacenó a 4ºC hasta que se reunió si se había preparado más de un lote (también conocido como tiempo de estadificación). Después de la reunión, la concentración final se ajustó a 5,0 mg/mL (±5%) y el principio activo se almacenó congelado.

1. Pre-conjugación de UF/DF: Eliminación de sacarosa

Los experimentos se realizaron para monitorizar la tasa de eliminación de sacarosa durante la UF/DF por ensayo de Ellman y estimar los diavolúmenes necesarios para lograr la mayor relación de SH por Ab.

Se encontró que es deseable realizar al menos 6 diavolúmenes con el fin de eliminar la sacarosa hasta un nivel que no impida la reducción de CR011. Para garantizar la robustez deben utilizarse al menos 10 diavolúmenes durante el procedimiento.

2. El efecto del porcentaje de DMSO en la agregación en la reacción de conjugación

Los experimentos se realizaron para determinar el efecto de DMSO en la reacción de conjugación sobre la: (1) agregación; y (2) relación molar de fármaco:Ab (es decir, completitud de la conjugación).

Se encontró que el porcentaje de agregados en la reacción con DMSO al 12% era más bajo que en DMSO al 15%, 4,4 y 3,0%, respectivamente. La formulación en tampón a pH 9,0 frente a tampón a pH 7,0 no tuvo ningún efecto sobre la agregación o el rendimiento, siempre que se incluyera 10% de sacarosa en la formulación. El porcentaje de agregados en las reacciones con DMSO al 10%, 8%, 6% y 4% (v/v) fueron el 2,7. 1,7. 1,0 y 0,5%, respectivamente. Esto sugiere que CR011 y CR011-AE eran muy susceptibles a la agregación cuando está presente un mayor porcentaje de DMSO.

Las cuatro reacciones de conjugación produjeron una relación molar final de 4,0 fármacos/Ab, sugiriendo que las cuatro reacciones se completaron. Los márgenes de seguridad para el porcentaje de DMSO en la reacción de conjugación son del 4 - 6%. Esto predijo dar un nivel de agregación del 1% o menos.

5. Investigación de la reacción lateral durante la conjugación de CR011 a vcMMAE

Los experimentos se realizaron para: (1) investigar el grado y la cinética de la reacción secundaria en la que el fármaco de maleimida se convierte en un producto secundario sin reaccionar produciendo una conjugación incompleta y baja carga de fármaco; (2) determinar factores que influyen la reacción secundaria; y (3) determinar si el lote de vcMMAE antiguo (SGD1006-0-04) se diferenció en la reactividad en comparación con el lote nuevo (SGD1006-0-06).

Las reacciones (100 µl) que contenían vcMMAE a 30 µM de concentración final se incubaron en tampón borato a pH 9,0 tanto en ausencia como en presencia de un exceso molar doble de TCEP (con respecto a vcMMAE). Las reacciones se inactivaron a 0, 2, 7 ó 15 min con NAcCys en exceso. El control constituido por vcMMAE en tampón fosfato a pH 7,0 se extinguió en el momento 15 min. Los cromatogramas se muestran en la Figura 23.

En el tampón fosfato a pH 7 15 min y en tampón borato a pH 9,0 0 min después de la adición del fármaco se forma un único producto extinguido con Cys (rt = 9,0 min) (véase A y B). En tampón borato a pH 9,0 se forma un producto secundario no reactivo (rt = 9,2 min) en un modo dependiente del tiempo (B, C, D y E). En tampón borato y en presencia de TCEP (tal como condiciones de conjugación de CR011), la formación del producto no reactivo se cataliza dando como resultado >90% de conversión de maleimida en succinimida después de sólo 2 min de incubación (F a I). Tanto el lote vcMMAE antiguo (SGD-1006-0-06) como el lote nuevo (SGD-1006-0-04) presentaron reactividad similar hacia un alto pH y TCEP, además de cinética similar.

La Figura 24 muestra la identificación por EM-CL del producto no reactivo como succinimidil-vcMMAE (rt = 9,2 min, m/z = 1318). La Figura 25 muestra la cinética relativa de formación de la succinimida en presencia o ausencia de TCEP.

Conclusiones

El producto secundario es un resultado de la conjugación realizada a pH 9 en lugar de a pH 7,4 (PBS). La formación del producto secundario está potenciada en presencia de TCEP. El producto secundario estable principal se ha identificado por EM-CL como succinimidil-vcMMAE. Queda por identificar los productos secundarios minoritarios y menos estables. Ambos lotes de vcMMAE se comportaron similarmente.

6. Vencimiento de la reacción secundaria durante la conjugación de CR011 a vcMMAE

Los experimentos se realizaron para investigar si la reacción secundaria puede vencerse proporcionando un gran exceso del fármaco para la conjugación.

Se propusieron varias formas para suprimir la reacción secundaria: (1) realizar la conjugación a menor pH, por ejemplo, 8,5 en lugar de 9,0 (alto riesgo debido a la solubilidad reducida de CR011); (2) eliminar el exceso de TCEP por UF/DF (no es práctico); y (3) elevar el exceso de vcMMAE añadido inicialmente (práctico).

100 mg de CR011 que se cambió previamente de tampón en borato 50 mM - NaCl 50 mM se redujeron con TCEP para generar 4,35 tioles libres por Ab. La reacción se dividió en dos mitades. Para la primera mitad de 50 mg se añadió un exceso del 10% de vcMMAE basado en 1 fármaco por relación de tiol. Para la segunda mitad se usó un exceso del 20%. Los conjugados se purificaron por UF/DF en histidina 10 mM pH 6/disolución al 10% de sacarosa. Los resultados se resumen en la Tabla 60.

Tabla 60. Preparación de conjugados de CR011-vcMMAE usando diversos excesos de vcMMAE basados en 1 fármaco por relación de tiol. Las relaciones de fármaco con respecto a Ab se determinaron por RP-HPLC.

	Exceso de vcMMAE, %	
	10	20
SH por Ab	4,35	4,35
Relación de fármaco con respecto a Ab (en la reacción)	3,9	4,1
Relación de fármaco con respecto a Ab (en el producto final)	3,7	4,0

Conclusiones

Se comparó una conjugación de 100 mg usando 10% frente a 20% de exceso de vcMMAE. El mayor exceso de vcMMAE proporcionó una relación de fármaco con respecto a Ab más próxima al valor esperado y, por tanto, se ha determinado que es óptima.

La anterior descripción y ejemplos detallan ciertas realizaciones preferidas de los anticuerpos y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Sin embargo, se apreciará que no importa cómo de detallado pueda aparecer lo anterior en el texto, los procedimientos de preparación y uso de los anticuerpos descritos en este documento pueden ponerse en práctica de muchas formas y la invención se define por las reivindicaciones adjuntas como se proporcionan por la Convención de patente europea. La memoria descriptiva anteriormente escrita se considera suficiente para permitir a un experto en la materia poner en práctica las realizaciones descritas en este documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0451]

<110> Curagen et. al.

<120> Anticuerpos con especificidad por GPNMB y usos de dichos anticuerpos

<130> 21402-669-061 (Cura 969)

<150> US 60/632,023
<151> 2004-11-30

<150> US 60/733,779
<151> 2005-11-07

<160> 395

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 347
<212> DNA
<213> Homo sapiens

NOTA ACLARATORIA 1: En el presente punto del Listado y en adelante, por "DNA" entenderemos "ADN"

<400> 1

```
aggtgcagct gcaggagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ttcggagacc ctgtccctca     60

cctgcactgt ctctggtgac tccatcagta attactactg gagctggatc cggcagcccc    120

cagggaaggg actggagtgg attgggtatt tctattacag tgggagcacc aactacaacc    180

cctccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag ttctccctga    240

aactgagctc tgtgaccgct gcggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga gataggggct    300

gggctgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcc                  347
```

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Asp Arg Gly Trp Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ser Ala
        115
```

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
            20                  25
```

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Asp Ser Ile Ser Asn Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Phe Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 7
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Arg Gly Trp Ala Asp Tyr
1 5

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagggccacc 60

ctctcctgca gaaccagtca gagtattagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ttcccaggct cctcatctat ggtgcttcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttattgtcag cagtatggta gctcgatcac cttcggccaa 300

gggacacgac tggagattaa acga 324

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ile
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
            20
```

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 19
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agttttaatt actactggag ctggatccgc 120

caccacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tccaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgacgc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg 300

tataactgga actactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc 360

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 21

<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

```
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr
1               5                  10                  15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20                  25                  30
```

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

```
Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr
1               5
```

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1               5                  10
```

<210> 28
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28

```
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc     60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct    120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc    180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagtct    240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccgtg gacgttcggc    300

caagggacca aggtggaaat caaacga                                        327
```

<210> 29
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Asn
            20                  25                  30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 30
<211> 23
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
            20
```

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

```
Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Asn Leu Val
1               5                  10
```

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

```
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1               5                   10                  15
```

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

```
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1               5
```

<210> 34
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

```
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
            20                  25                  30
```

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

```
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Trp Thr
1               5                   10
```

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 37
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37

atcaccttga aggagtctgg tcctacgctg gtgaaaccca cacagaccct cacgctgacc 60

tgcaccttct ctgggttctc actcagcgct ggtggagtgg gtgtgggctg gatccgtcag 120

cccccaggaa aggccctgga gtggcttgca ctcatttatt ggaatgatga taagcgctac 180

agcccatctc tgaggagcag gctcaccatc accaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240

cttacaatta ccaacatgga ccctgtggac acagccacat attattgtgc acacagtcac 300

tatgattacg attgggggag ttactttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcc 369

<210> 38
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

```
Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1               5                  10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Gly Gly
            20                  25                  30

Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Arg Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala His Ser His Tyr Asp Tyr Asp Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 39
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

```
Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1               5                  10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
            20
```

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

```
Gly Phe Ser Leu Ser Ala Gly Gly Val Gly Val Gly
1               5                  10
```

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Ile Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25 30

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ser His Tyr Asp Tyr Asp Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1               5                   10
```

<210> 46
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46

```
gatattgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc     60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcttg gatagtgatg atggaaacac ctatttggac    120

tggtacctgc agaagccagg acagtctcca cagctcctga tctatacgct ttcctatcgg    180

gcctctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaac    240

atcagcaggg tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcatgcaacg tatagagttt    300

cctatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaac ga                       342
```

<210> 47
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn
65                  70                  75                  80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
                85                  90                  95

Arg Ile Glu Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys Arg
```

<210> 48
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
            20
```

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Asp

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser
1 5

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 55
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgctaatt actactggac ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180

tgcaacccgt ccctcaagag tcgagttatc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg 300

tataactgga actactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc 360

<210> 56
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 57
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
20

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ala Asn Tyr Tyr Trp Thr
1 5 10

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 60

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 61
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 64

gatatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca ggagagacct 120

ggccaggctc ccagactcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataagt ggcctccgtg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat cgaacgaact 330

<210> 65
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg
100 105

<210> 66
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
            20
```

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

```
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

```
Trp Tyr Gln Glu Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1               5                   10                  15
```

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

```
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1               5
```

<210> 70
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

```
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
            20                  25                  30
```

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

```
Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Pro Trp Thr
1               5                   10
```

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

```
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg
1               5                   10
```

<210> 73
<211> 378
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 73

```
cagctggtgg agtctggggg aggcgtggtc cagcctggga ggtccctgag actctcctgt     60

gcagcctctg gattcgcctt cagtagctat ggcatgcact gggtccgcca ggctccaggc    120

aaggggctgg agtgggtggc agttatatca tatgatggaa ataataaata ctatgcagac    180

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatctgcaa    240

atgaacagcc tgagagctga ggacacggct gtgtattact gtgcgagaga tctagtggtt    300

cggggaatta gggggtacta ctactacttc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg    360

gtcaccgtct cctcagcc                                                  378
```

<210> 74
<211> 126
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

```
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
1               5                   10                  15

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met
            20                  25                  30

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val
        35                  40                  45

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    50                  55                  60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65                  70                  75                  80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85                  90                  95

Asp Leu Val Val Arg Gly Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met
            100                 105                 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120                 125
```

<210> 75
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

```
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
1               5                   10                  15

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
            20
```

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 77
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 78
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 79
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 80
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Asp Leu Val Val Arg Gly Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 82

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaggtct acaaactccg 300

atcaccttcg gccaagggac acgactggag attaaacga 339

<210> 83
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

```
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
                85                  90                  95

Leu Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg
```

<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
            20
```

<210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

```
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1               5                   10                  15
```

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 88
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 91
<211> 366

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 91

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca ttcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggacgtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac gcggctgtgt attactgtgc gagagatccc 300

tttgactatg gtgactcctt ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360

tcagcc 366

<210> 92
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Pro Phe Asp Tyr Gly Asp Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 93
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

            20                  25
```

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 95
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 17
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Val Ile Trp Phe Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 97
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

Asp Pro Phe Asp Tyr Gly Asp Ser Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 100
<211> 315
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 100

ctgactcagt ctccatcctc cctgtctgca tctgtaagag acagagtcac catcacttgc 60

cgggcgagtc aggacattag caattattta gcctggtatc agcagaaacc agggaaagtt 120

cctaatctcc tgatctatgc tgcatccact ttgcaatcag gggtcccatc tcggttcagt 180

ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gcctgcagcc tgaagatgtt 240

gcaacttatt actgtcaaaa gtataacagt gccccgctca ctttcggcgg agggaccaag 300

gtggagatca aacga 315

<210> 101
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

```
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
1               5                   10                  15

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp
            20                  25                  30

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
        35                  40                  45

Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val
65                  70                  75                  80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly
                85                  90                  95

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 102
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

```
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
1               5                   10                  15

Thr Ile Thr Cys
            20
```

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

```
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 104
<211> 15

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 105
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Ala Ser Thr Leu Gln
1 5

<210> 106
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 109
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 109

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgacctggat ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtatta gtggtagtat cacacactac 180

gcagactcag tgaagggccg attcaccatg tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgga 300

gcagcagctg gtacggatgc ttttgatatc tggggccacg ggacaaaggt caccgtctct 360

tcagcc 366

<210> 110
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Tyr Ile Ser Ile Ser Gly Ser Ile Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Gly Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
            100                 105                 110

His Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 111
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
            20                  25
```

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

```
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Thr
1               5                   10
```

<210> 113
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 114
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Tyr Ile Ser Ile Ser Gly Ser Ile Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 115
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

Asp Gly Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 117
<211> 12
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

```
Trp Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser Ala
1               5                   10
```

<210> 118
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 118

```
gagatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctatctgtgt ctccagggga cagagccacc     60

ctctcctgca gggccagtca gaatgttagc agcaacttgg cctggtacca gcagaaacct    120

ggccaggctc ccaggctcct catctttggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc    180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctacagtct    240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tatcattact ggcccacttt cggccctggg    300

accaaagtgg atatcaaacg a                                              321
```

<210> 119
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Tyr Trp Pro Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 120
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1               5                  10                  15

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys
            20
```

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

```
Arg Ala Ser Gln Asn Val Ser Ser Asn Leu Ala
1               5                  10
```

<210> 122
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Phe
1 5 10 15

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 123

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 124
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 125
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 125

Gln Gln Tyr His Tyr Trp Pro Thr
1 5

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 126

```
Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
1               5                  10
```

<210> 127
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 127

```
cagctggtgc agtctggggc tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtgaa ggtctcctgc     60

aaggcttctg gatacacctt caccggcttc tatatgcact gggtgcgaca gacccctgga    120

caagggcttg agtggatggg atggatcaac cctaacagtg gtggcacata ttatgtacag    180

aagtttcagg gcagggtcac catgaccagg gacacgtcca tcagcacagt ctacatggag    240

ctgagcaggt tgagatctga cgacacggcc gtatattact gtgcgagaga tgggtatagc    300

agtggagagg actggttcga cccctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc    360
```

<210> 128
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128

```
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
1               5                  10                  15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Tyr Met
            20                  25                  30

His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
        35                  40                  45

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Val Gln Lys Phe Gln Gly
    50                  55                  60

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr Met Glu
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
                 85                  90                  95

Asp Gly Tyr Ser Ser Gly Glu Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly
             100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
         115                 120
```

<210> 129
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129

```
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
1               5                   10                  15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
             20
```

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130

```
Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Tyr Met His
1               5                   10
```

<210> 131
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131

```
Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1               5                   10
```

<210> 132
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Val Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 133
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 134
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Asp Gly Tyr Ser Ser Gly Glu Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 136
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 136

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtggtg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acaccttccg 300

ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacga 339

<210> 137
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 138
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 139
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 140
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 140

Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 141

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 142
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 142

```
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
            20                  25                  30
```

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 143

```
Met Gln Ser Ile His Leu Pro Leu Thr
1               5
```

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144

```
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1               5                   10
```

<210> 145
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 145

caggtgcagc tggagcagtc gggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagattc

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcattc attagtagta gtagtagtta catatactac

gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaggac

tgggtgggag ctacctttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc

<210> 146
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

```
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Phe Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Asp Trp Val Gly Ala Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 147
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

```
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Phe Ser Cys Ala Ala Ser
            20                  25
```

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

```
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn
1               5                   10
```

<210> 149
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 150
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Phe Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 151
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 152

Glu Asp Trp Val Gly Ala Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 153
<211> 12

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 153

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 154
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 154

gacattcagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggcattagg aattatttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagttc ctaagctcct gatctatgct gcttccgctt tgaaattagg ggtcccatct 180

cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg ccccgatcac cttcggccaa 300

gggacacgac tggacattaa acga 324

<210> 155
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 155

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ala Leu Lys Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 156
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 156

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 157

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 158
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 158

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 159

Ala Ala Ser Ala Leu Lys Leu
1 5

<210> 160
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 160

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 161

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Ile Thr
1 5

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 162

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 163
<211> 396
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 163

caggtgcagc tggagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagaa cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt atttctggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gaacacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagttg acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaaac tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagac 300

tattactatg atactagtgg tttttcctac cgttacgact ggtactacgg tatggacgtc 360

tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tcagcc 396

<210> 164
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 164

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Arg Tyr
100 105 110

Asp Trp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser Ala
130

<210> 165
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 165

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 166
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 166

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Phe Trp Ser
1 5 10

<210> 167
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 167

Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 168
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 168

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 169
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 169

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 170
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 170

Asp Tyr Tyr Tyr Asp Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Arg Tyr Asp Trp Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 171
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 171

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 172
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 172

gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaaatgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataatactt acccggcgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg aaatcaaacg a 321

<210> 173
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 173

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
            20                  25                  30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Ala
                85                  90                  95

        Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 174
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 174

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
            20
```

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 175

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 176
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 176

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 177

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Asn
1 5

<210> 178
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 178

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 179
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 179

Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Ala
1 5

<210> 180

<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 180

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 181
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 181

cagctggtgc agtctggagc agaagtgaaa aagcccgggg agtctctgaa gatctcctgt 60

cagggttctg gatacatctt taccaactac tggatcggct gggtgcgcca gatgcccggg 120

aaaggcctgg agtggatggg ggtcatctat cctgatgact ctgataccag atacagcccg 180

tccttccaag gccaggtcac catctcagcc gacaagtcca tcagcaccgc ctacctgcag 240

tggagcagcc tgaaggcctc ggacaccgcc atatattact gtgcgagaca aaaatggcta 300

caacacccct ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc agcc 354

<210> 182
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 182

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
1 5 10 15

Lys Ile Ser Cys Gln Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Trp Ile

20 25 30

Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Val
35 40 45

Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
50 55 60

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Gln Lys Trp Leu Gln His Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 183
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 183

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
1 5 10 15

Lys Ile Ser Cys Gln Gly Ser
20

<210> 184
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 184

Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 185
<211> 14

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 185

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 186
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 186

Val Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 187
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 187

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 188

Gln Lys Trp Leu Gln His Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 189
<211> 12

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 189

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 190
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 190

gaaattgtgt tgacgcagtc accaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60

ctctcatgca gggccagtca gagtgttagc agcagatact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaacga 327

<210> 191
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 191

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
                85                  90                  95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 192
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 192

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys
            20
```

<210> 193
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 193

```
      Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
      1               5                  10
```

<210> 194
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 194

```
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1               5                   10                  15
```

<210> 195
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 195

```
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1               5
```

<210> 196
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 196

```
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
            20                  25                  30
```

<210> 197
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 197

```
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
1               5
```

<210> 198
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 198

```
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1               5                   10
```

<210> 199
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 199

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaaactat 180

gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc 300

tttggttcgg ggagtctcct ctactttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcc 369

<210> 200
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 200

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 201
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 201

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 202

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 203
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 203

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 204
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 204

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 205
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 205

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 206
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 206

Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 207
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 207

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 208
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 208

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtggtg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acaccttccg 300

ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacga 339

<210> 209
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 209

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 210
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 210

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 211
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 211

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 212
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 212

Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 213

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 214
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 214

```
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1               5                   10                  15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
            20                  25                  30
```

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 215

```
Met Gln Ser Ile His Leu Pro Leu Thr
1               5
```

<210> 216
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 216

```
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1               5                   10
```

<210> 217
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 217

```
caggtgcagc tggagcagtc gggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaat aactatggca tgcactgggt ccgccaggct     120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat     180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat     240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatgag     300

gaatactact atgtttcggg gcttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc     360

tcagcc                                                                366
```

<210> 218
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 218

```
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Asp Glu Glu Tyr Tyr Tyr Val Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 219
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 219

```
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
            20                  25
```

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 221
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 221

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 222
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 222

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 223
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 223

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25 30

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 224

```
Asp Glu Glu Tyr Tyr Tyr Val Ser Gly Leu Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 225
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 225

```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1               5                   10
```

<210> 226
<211> 315
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 226

```
ctgactcagt ctccatcctc cctgtctgca tctgtaagag acagagtcac catcacttgc     60

cgggcgagtc aggacattag caattattta gcctggtatc agcagaaacc agggaaagtt    120

cctaatctcc tgatctatgc tgcatccact ttgcaatcag gggtcccatc tcggttcagt    180

ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gcctgcagcc tgaagatgtt    240

gcaacttatt actgtcaaaa gtataacagt gccccgctca ctttcggcgg agggaccaag    300

gtggagatca aacga                                                     315
```

<210> 227
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 227

```
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
1               5                   10                  15

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp
            20                  25                  30

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
        35                  40                  45
```

```
Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val
65                  70                  75                  80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly
                85                  90                  95

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 228
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 228

```
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg Asp Arg Val
1               5                   10                  15

Thr Ile Thr Cys
            20
```

<210> 229
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 229

```
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 230
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 230

```
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1               5                   10                  15
```

<210> 231
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 231

Ala Ala Ser Thr Leu Gln
1 5

<210> 232
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 232

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 233

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 234
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 234

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 235
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 235

```
cagatcacct tgaaggagtc tggtcctacg ctggtgacac ccacacagac cctcacgctg     60

acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actggtggaa tgggtgtggg ctggatccgt    120

cagcccccag gaaaggccct ggactggctt acactcattt attggaatga tgataagcac    180

tacagcccat ctctgaagag caggcttacc atcaccaagg acacctccaa aaaccaggtg    240

gtccttagaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cttattactg tgcacacctg    300

cattacgata ttttgactgg ttttaacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc    360

gtctcctcag cc                                                        372
```

<210> 236
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 236

```
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Thr Pro Thr Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly
            20                  25                  30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Asp
        35                  40                  45

Trp Leu Thr Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys His Tyr Ser Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65                  70                  75                  80

Val Leu Arg Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala His Leu His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Phe Asn Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120
```

<210> 237
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 237

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Thr Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
20 25

<210> 238
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 238

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

<210> 239
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 239

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Asp Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 240
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 240

Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys His Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 241
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 241

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Arg
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25 30

<210> 242
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 242

Leu His Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Phe Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 243
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 243

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 244
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 244

gatattgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcttg gatagtgatg atggaaacac ctatttggac 120

tggtacctgc agaagccagg gcagtctcca cagctcctga tctatacgct ttcctatcgg 180

gcctctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaaa 240

atcagcaggg tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcatgcaacg tatagagttt 300

ccgctcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaac ga 342

<210> 245
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 245

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65                  70                  75                  80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
                85                  90                  95

Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110

Lys Arg
```

<210> 246
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 246

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
            20
```

<210> 247
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 247

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Asp

<210> 248
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 248

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 249
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 249

Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser
1 5

<210> 250
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 250

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 251
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 251

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 252
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 252

```
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1               5                   10
```

<210> 253
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is E or Q

NOTA ACLARATORIA 2: En el presente punto del Listado y en adelante, por "VARIANT" entenderemos "VARIANTE"

NOTA ACLARATORIA 3: En el presente punto del Listado y en adelante, por "Xaa is" entenderemos "Xaa es" y por "or" entenderemos "o"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is T or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> Xaa is A, F or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)..(28)
<223> Xaa is N or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (30)..(30)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (32)..(32)
<223> Xaa is T or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> Xaa is Q or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (53)..(53)
<223> Xaa is S or N

<220>

<221> VARIANT
<222> (56)..(56)
<223> Xaa is C, S, or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (65)..(65)
<223> Xaa is I or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (78)..(78)
<223> Xaa is K or T

<400> 253

```
Xaa Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Xaa Leu Ser Leu Thr
1               5                   10                  15

Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Xaa
            20                  25                  30

Trp Ile Arg Xaa His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Ser Gly Xaa Thr Tyr Xaa Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
    50                  55                  60

Xaa Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Xaa Leu Ser
65                  70                  75                  80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85                  90
```

<210> 254
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is A, F, or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is N or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is T or S

<400> 254

```
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Xaa
1               5                   10
```

<210> 255
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is C, S, or Y

<400> 255

```
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Xaa Thr Tyr Xaa Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 256
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (30)..(30)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (38)..(38)
<223> Xaa is A or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (57)..(57)
<223> Xaa is N or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (59)..(59)
<223> Xaa is A or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (64)..(64)
<223> Xaa is D or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (77)..(77)
<223> Xaa is A or V

<400> 256

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
1 5 10 15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Xaa Tyr Met
20 25 30

His Trp Val Arg Gln Xaa Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
35 40 45

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Xaa Tyr Xaa Gln Lys Phe Gln Xaa
50 55 60

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Xaa Tyr Met Glu
65 70 75 80

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

<210> 257
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is Y or F

<400> 257

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Xaa Tyr Met His
1 5 10

<210> 258
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is N or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is A or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> Xaa is D or G

<400> 258

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Xaa Tyr Xaa Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Xaa

<210> 259
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is Y or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is Y or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is Y or L

<400> 259

Xaa Xaa Xaa Gly Ser Gly Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 260
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> Xaa is K or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (30)..(30)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (31)..(31)
<223> Xaa is S or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (33)..(33)
<223> Xaa is M or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (47)..(47)
<223> Xaa is D or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (50)..(50)
<223> Xaa is A or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (59)..(59)
<223> Xaa is R or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (65)..(65)
<223> Xaa is K or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (82).. (82)
<223> Xaa is T or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (83)..(83)

<223> Xaa is M or I

<400> 260

```
Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Xaa Pro Thr Gln Thr
1               5                  10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Xaa Xaa Gly
            20                  25                  30

Xaa Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Xaa Trp
        35                  40                  45

Leu Xaa Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Xaa Tyr Ser Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Xaa Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65                  70                  75                  80

Leu Xaa Xaa Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala His
```

<210> 261
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is M or V

<400> 261

```
Gly Phe Ser Leu Ser Xaa Xaa Gly Xaa Gly Val Gly
1               5                  10
```

<210> 262
<211> 16

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is R or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> Xaa is K or R

<400> 262

```
Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Xaa Tyr Ser Pro Ser Leu Xaa Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is Y or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is Y or N

<400> 263

```
Xaa Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Xaa Xaa
1               5
```

<210> 264
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is V or D

<400> 264

Tyr Asp Tyr Xaa Trp Gly Ser
1 5

<210> 265
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is V or E

<220>

<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is E or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (30)..(30)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (31)..(31)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (34)..(34)
<223> Xaa is M or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (53)..(53)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (56)..(56)
<223> Xaa is S or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (91)..(91)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (98)..(98)
<223> Xaa is R or K

<400> 265

```
Gln Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr
            20                  25                  30

Gly Xaa His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    .   35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Xaa Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Xaa
```

<210> 266
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is M or I

<400> 266

```
Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Gly Xaa His
1               5                   10
```

<210> 267
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or R

<400> 267

```
Val Ile Trp Xaa Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 268
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or L

<400> 268

```
Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Xaa
1               5
```

<210> 269
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (5).. (5)
<223> Xaa is Y or S

<400> 269

```
Asp Tyr Gly Asp Xaa
1               5
```

<210> 270
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (31)..(31)
<223> Xaa is D or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (33)..(33)
<223> Xaa is S or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (35)..(35)
<223> Xaa is S or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (53)..(53)
<223> Xaa is S or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (57)..(57)
<223> Xaa is T or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (58)..(58)
<223> Xaa is T or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (59)..(59)
<223> Xaa is Y or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (70)..(70)
<223> Xaa is I or M

<400> 270

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr
            20                  25                  30

Xaa Met Xaa Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Tyr Ile Ser Xaa Ser Gly Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Xaa Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg
```

<210> 271
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is D or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is S or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is S or T

<400> 271

```
Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa Met Xaa
1               5                   10
```

<210> 272
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is S or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is T or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is T or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Y or H

<400> 272

Tyr Ile Ser Xaa Ser Gly Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 273
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is I or G

<400> 273

Xaa Xaa Ala Ala Ala Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 274
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is E or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is V or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is E or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (20).. (20)
<223> Xaa is F or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (50)..(50)
<223> Xaa is S or F

<400> 274

```
Xaa Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Xaa Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Xaa Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

                    85                  90                  95

        Ala Arg
```

<210> 275
<211> 17
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is S or F

<400> 275

Xaa Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 276
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is I or W

<400> 276

Xaa Xaa Val Gly Ala Thr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 277
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (26)..(26)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (54).. (54)
<223> Xaa is S or N

<400> 277

```
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
1               5                   10                  15

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Gly Met
            20                  25                  30

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val
        35                  40                  45

Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    50                  55                  60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65                  70                  75                  80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
                85                  90                  95
```

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (3) ..(3)
<223> Xaa is T or A

<400> 278

```
Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1               5                   10
```

<210> 279
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is S or N

<400> 279

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Xaa Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is I or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is T or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is M or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is V or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is I or R

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa is I or G

<400> 280

Xaa Xaa Xaa Val Arg Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 281
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (31)..(31)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (51)..(51)
<223> Xaa is I or F

<400> 281

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Xaa Ser Ile Ser Xaa Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Xaa Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg
```

<210> 282
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is S or N

<400> 282

```
Gly Xaa Ser Ile Ser Xaa Tyr Tyr Trp Ser
1               5                   10
```

<210> 283
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is I or F

<400> 283

```
Tyr Xaa Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is S or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is S or R

<400> 284

```
Xaa Xaa Gly Trp Asp Tyr
1               5
```

<210> 285
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (21)..(21)
<223> Xaa is K or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (26)..(26)
<223> Xaa is S or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> Xaa is S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (48)..(48)
<223> Xaa is I or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (52)..(52)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (91)..(91)
<223> Xaa is M or I

<400> 285

```
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
1               5                   10                  15

Lys Ile Ser Cys Xaa Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr Trp Ile
            20                  25                  30

Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa
        35                  40                  45

Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
    50                  55                  60

Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
65                  70                  75                  80

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85                  90                  95
```

<210> 286
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (3) ..(3)
<223> Xaa is S or I

<220>
<221> VARIANT

<222> (6)..(6)
<223> Xaa is S or N

<400> 286

Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 287
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is I or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is G or D

<400> 287

Xaa Ile Tyr Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 288
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is R or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is L or H

<400> 288

Xaa Trp Leu Gln Xaa Phe Asp Tyr
1 5

<210> 289

<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 289

```
Lys Arg Phe His Asp Val Leu Gly Asn Glu Arg Pro Ser Ala Tyr Met
1               5                  10                  15

Arg Glu His Asn Gln Leu Asn Gly Trp Ser Ser Asp Glu Asn Asp Trp
            20                  25                  30

Asn Glu Lys Leu Tyr Pro Val Trp Lys Arg Gly Asp Met Arg Trp Lys
        35                  40                  45

Asn Ser Trp Lys Gly Gly Arg Val Gln Ala Val Leu Thr Ser Asp Ser
    50                  55                  60

Pro Ala Leu Val Gly Ser Asn Ile Thr Phe Ala Val Asn Leu Ile Phe
65                  70                  75                  80

Pro Arg Cys Gln Lys Glu Asp Ala Asn Gly Asn Ile Val Tyr Glu Lys
                85                  90                  95

Asn Cys Arg Asn Glu Ala Gly Leu Ser Ala Asp Pro Tyr Val Tyr Asn
            100                 105                 110

Trp Thr Ala Trp Ser Glu Asp Ser Asp Gly Glu Asn Gly Thr Gly Gln
        115                 120                 125

Ser His His Asn Val Phe Pro Asp Gly Lys Pro Phe Pro His His Pro
    130                 135                 140

Gly Trp Arg Arg Trp Asn Phe Ile Tyr Val Phe His Thr Leu Gly Gln
145                 150                 155                 160

Tyr Phe Gln Lys Leu Gly Arg Cys Ser Val Arg Val Ser Val Asn Thr
                165                 170                 175

Ala Asn Val Thr Leu Gly Pro Gln Leu Met Glu Val Thr Val Tyr Arg
            180                 185                 190
```

```
Arg His Gly Arg Ala Tyr Val Pro Ile Ala Gln Val Lys Asp Val Tyr
        195                 200                 205

Val Val Thr Asp Gln Ile Pro Val Phe Val Thr Met Phe Gln Lys Asn
    210                 215                 220

Asp Arg Asn Ser Ser Asp Glu Thr Phe Leu Lys Asp Leu Pro Ile Met
225                 230                 235                 240

Phe Asp Val Leu Ile His Asp Pro Ser His Phe Leu Asn Tyr Ser Thr
                245                 250                 255

Ile Asn Tyr Lys Trp Ser Phe Gly Asp Asn Thr Gly Leu Phe Val Ser
            260                 265                 270

Thr Asn His Thr Val Asn His Thr Tyr Val Leu Asn Gly Thr Phe Ser
        275                 280                 285

Leu Asn Leu Thr Val Lys Ala Ala Ala Pro Gly Pro Cys Pro Pro Pro
    290                 295                 300

Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Leu Ala Thr Thr
305                 310                 315                 320

Leu Lys Ser Tyr Asp Ser Asn Thr Pro Gly Pro Ala Gly Asp Asn Pro
                325                 330                 335

Leu Glu Leu Ser Arg Ile Pro Asp Glu Asn Cys Gln Ile Asn Arg Tyr
            340                 345                 350

Gly His Phe Gln Ala Thr Ile Thr Ile Val Glu Gly Ile Leu Glu Val
        355                 360                 365

Asn Ile Ile Gln Met Thr Asp Val Leu Met Pro Val Pro Trp Pro Glu
    370                 375                 380

Ser Ser Leu Ile Asp Phe Val Val Thr Cys Gln Gly Ser Ile Pro Thr
385                 390                 395                 400

Glu Val Cys Thr Ile Ile Ser Asp Pro Thr Cys Glu Ile Thr Gln Asn
                405                 410                 415

Thr Val Cys Ser Pro Val Asp Val Asp Glu Met Cys Leu Leu Thr Val
            420                 425                 430
```

```
Arg Arg Thr Phe Asn Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Val Asn Leu Thr Leu
        435                 440                 445

Gly Asp Asp Thr Ser Leu Ala Leu Thr Ser Thr Leu Ile Ser Val Pro
    450                 455                 460

Asp Arg Asp Pro Ala Ser
465                 470
```

<210> 290
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

NOTA ACLARATORIA 4: En el presente punto del Listado y en adelante, por "Artificial Sequence" entenderemos "Secuencia Artificial"

<220>
<223> chemically synthesized primer

NOTA ACLARATORIA 5: En el presente punto del Listado y en adelante, por "chemically synthesized primer" entenderemos "cebador químicamente sintetizado"

<400> 290
caccatggac tggcacctgg aggatc 26

<210> 291
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 291
caccatggac tggacctgga gacatc 26

<210> 292
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 292
caccatggac tggacctgga gggtc 25

<210> 293
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 293
caccatggac tggatttgga ggatc 25

<210> 294
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 294
caccatggac acactttgct cacac 25

<210> 295
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 295
caccatggaa gttggggctg agctgg 26

<210> 296
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 296
caccatggag ttgtggactg agctgg 26

<210> 297
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 297
caccatggag tttgggctgt agctgg 26

<210> 298
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 298
caccatggaa ctggggctcc gctgg 25

<210> 299
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 299
caccatggag ttggggctgt gctgg 25

<210> 300
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 300
caccatggag ttttggctga gctgg 25

<210> 301
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 301
caccatgacg gagtttgggc tgagc 25

<210> 302
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 302
caccatgaaa gcacctgtgg ttcttc 26

<210> 303
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 303
caccatgaaa catctgtggt tcttc 25

<210> 304
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 304
caccatgggg tcaaccgcca tcctc 25

<210> 305
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 305
caccatgtct gtctccttcc tcatcttc 28

<210> 306
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 306
atggggtccc aggttcacct c 21

<210> 307
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 307
atgttgccat cacaactcat tg 22

<210> 308
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 308

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

```
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg
```

<210> 309
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 309

```
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc     60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc    120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaaactat    180

gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac    240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc    300

tttggttcgg ggagtctcct ctactttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc    360

tcctcagcc                                                            369
```

<210> 310
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 310

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
                                    --

        50                  55                  60

    Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
    65                  70                  75                  80

    Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                    85                  90                  95

    Ala Arg Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp
                100                 105                 110

    Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
            115                 120
```

<210> 311
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 311

```
    Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
    1               5                   10                  15

    Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
                20                  25
```

<210> 312
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 312

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 313
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 313

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 314
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 314

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 315
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 315

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 316
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 316

Asp Phe Phe Gly Ser Gly Ser Leu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 317
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 317

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 318
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 318

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtggtg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acaccttccg 300

ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacga 339

<210> 319
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 319

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
                85                  90                  95

Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg
```

<210> 320
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 320

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
            20
```

<210> 321

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 321

```
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1               5                  10                  15
```

<210> 322
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 322

Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 323
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 323

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 324
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 324

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 325
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 325

Met Gln Ser Ile His Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 326
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 326

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 327
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 327
gaattcagag ttaaaccttg ag 22

<210> 328
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 328
caggaatctg atctgttacc ac 22

<210> 329
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 329
ctgaccctac aagatgccaa gag 23

<210> 330
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 330
atcatgcatt gcaacattta ttgatggag 29

<210> 331
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 331

ttggcagatt gtctgtagcc 20

<210> 332
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 332
aggcattgtg catgctgctt 20

<210> 333
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 333
tattgaaagt gccgagatcc 20

<210> 334
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 334
tgcaaggacc acagccatc 19

<210> 335
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 335
tcaatggaac cttcagcctt a 21

<210> 336
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 336
gaaggggtgg gttttgaag 19

<210> 337

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 337
ctcactgtga aagctgcagc accag 25

<210> 338
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 338
tcaatggaac cttcagcctt a 21

<210> 339
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 339
gaaggggtgg gttttgaag 19

<210> 340
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 340
ctcactgtga aagctgcagc accag 25

<210> 341
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

NOTA ACLARATORIA 6: En el presente punto del Listado y en adelante, por "chemically synthesized" entenderemos "químicamente sintetizado"

<400> 341
tgatcagtaa ggatttcacc tctgtttgta 30

<210> 342
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 342
accttgtcat gtaccatcaa taaagtaccc 30

<210> 343
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 343

Ala Thr Thr Leu Lys Ser Tyr Asp Ser Asn Thr Pro
1 5 10

<210> 344
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 344

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu
20 25

<210> 345
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 345
tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt gaaatagtga tgacgcagtc 60

<210> 346
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 346
ccggaattct tactatttgt catcatcgtc cttataatcg ctagctgagg agacggt 57

<210> 347
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 347
acgcgtcgac ccaccatgga agccccagcg cagcttctct tcctcctgct actctggctc 60

<210> 348
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 348
tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt gaaatagtga tgacgcagtc 60

<210> 349
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 349
ccggaattct tactatttgt catcatcgtc cttataatcg ctagctttca gctccag 57

<210> 350
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 350
acgcgtcgac ccaccatgga agccccagcg cagcttctct tcctcctgct actctggctc 60

<210> 351
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 351
actctggctc ccagatacca ccggagaaat agtgatgacg cagtctccag ccacc 55

<210> 352
<211> 51
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 352
ccgctcgagc tatttgtcat catcgtcctt ataatctttc agctccagct t 51

<210> 353
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 353

tcttcgcgac caccatggaa accccagcgc agcttctctt cctcctgcta ctctggctcc 60

cagataccac cgga 74

<210> 354
<211> 852
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized primer

<400> 354

atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagtct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccgtg gacgttcggc 360

caagggacca aggtggaaat caaactttcc gcggacgatg cgaaaaagga tgctgcgaag 420

aaagatgacg ctaagaaagá cgatgctaaa aaggacctgc aggtgcagct gcaggagtcg 480

ggcccaggac tggtgaagcc ttcacagacc ctgtccctca cctgcactgt ctctggtggc 540

tccatcagca gttttaatta ctactggagc tggatccgcc accacccagg gaagggcctg 600

gagtggattg ggtacatcta ttacagtggg agcacctact ccaacccgtc cctcaagagt 660

cgagttacca tatcagtaga cacgtctaag aaccagttct ccctgacgct gagctctgtg 720

actgccgcgg acacggccgt gtattactgt gcgagagggt ataactggaa ctactttgac 780

tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctcagcta gcgattataa ggacgatgat 840

gacaaatagt aa 852

<210> 355
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 355

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Asn Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
130 135 140

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
165 170 175

```
Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
            180                 185                 190

Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
        195                 200                 205

Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val
225                 230                 235                 240

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp
                245                 250                 255

Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            260                 265                 270

Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
        275                 280
```

<210> 356
<211> 1617
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 356

```
atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt     60

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc    120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct    180

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc    240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagtct    300

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccgtg gacgttcggc    360

caagggacca aggtggaaat caaactttcc gcggacgatg cgaaaaagga tgctgcgaag    420

aaagatgacg ctaagaaaga cgatgctaaa aaggacctgc aggtgcagct gcaggagtcg    480

ggcccaggac tggtgaagcc ttcacagacc ctgtccctca cctgcactgt ctctggtggc    540

tccatcagca gttttaatta ctactggagc tggatccgcc accacccagg gaagggcctg    600

gagtggattg ggtacatcta ttacagtggg agcacctact ccaacccgtc cctcaagagt    660
```

cgagttacca tatcagtaga cacgtctaag aaccagttct ccctgacgct gagctctgtg 720

actgccgcgg acacggccgt gtattactgt gcgagagggt ataactggaa ctactttgac 780

tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctcaggag gtggtggatc cgatatcaaa 840

ctgcagcagt caggggctga actggcaaga cctggggcct cagtgaagat gtcctgcaag 900

acttctggct acacctttac taggtacacg atgcactggg taaaacagag gcctggacag 960

ggtctggaat ggattggata cattaatcct agccgtggtt atactaatta caatcagaag 1020

ttcaaggaca aggccacatt gactacagac aaatcctcca gcacagccta catgcaactg 1080

agcagcctga catctgagga ctctgcagtc tattactgtg caagatatta tgatgatcat 1140

tactgccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcact ttccgcggac 1200

gatgcgaaaa aggatgctgc gaagaaagat gacgctaaga aagacgatgc taaaaaggac 1260

ctggacattc agctgaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 1320

accatgacct gcagagccag ttcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtca 1380

ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaag tggcttctgg agtcccttat 1440

cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct 1500

gaagatgctg ccacttatta ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttcggtgct 1560

gggaccaagc tggagctgaa agctagcgat tataaggacg atgatgacaa atagtaa 1617

<210> 357
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 357

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                  10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Asp Asn Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65                  70                  75                  80
```

```
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
            100                 105                 110

Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
    130                 135                 140

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
                165                 170                 175

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
            180                 185                 190

Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
        195                 200                 205

Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val
225                 230                 235                 240

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp
                245                 250                 255

Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
        275                 280                 285

Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr
    290                 295                 300

Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
305                 310                 315                 320
```

```
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn
                325                 330                 335

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser
            340                 345                 350

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
        355                 360                 365

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp
    370                 375                 380

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp
385                 390                 395                 400

Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp
                405                 410                 415

Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
            420                 425                 430

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
        435                 440                 445

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
    450                 455                 460

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr
465                 470                 475                 480

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
                485                 490                 495

Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
            500                 505                 510

Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ala
        515                 520                 525

Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    530                 535
```

<210> 358
<211> 1677
<212> DNA
<213> Artificial Sequence <220>
<223> chemically synthesized

<400> 358

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttgac aacaacttag tctggtacca gcagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagtag tctgcagtct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctccgtg gacgttcggc 360

caagggacca aggtggaaat caaactttcc gcggacgatg cgaaaaagga tgctgcgaag 420

aaagatgacg ctaagaaaga cgatgctaaa aaggacctgc aggtgcagct gcaggagtcg 480

ggcccaggac tggtgaagcc ttcacagacc ctgtccctca cctgcactgt ctctggtggc 540

tccatcagca gttttaatta ctactggagc tggatccgcc accacccagg gaagggcctg 600

gagtggattg ggtacatcta ttacagtggg agcacctact ccaacccgtc cctcaagagt 660

cgagttacca tatcagtaga cacgtctaag aaccagttct ccctgacgct gagctctgtg 720

actgccgcgg acacggccgt gtattactgt gcgagagggt ataactggaa ctactttgac 780

tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctcattat cagcggatga cgccaagaaa 840

gacgcagcca aaaaggacga tgcaaagaag gatgacgcaa agaaagattt agatatcaaa 900

ctgcagcagt caggggctga actggcaaga cctggggcct cagtgaagat gtcctgcaag 960

acttctggct acacctttac taggtacacg atgcactggg taaaacagag gcctggacag 1020

ggtctggaat ggattggata cattaatcct agccgtggtt atactaatta caatcagaag 1080

ttcaaggaca aggccacatt gactacagac aaatcctcca gcacagccta catgcaactg 1140

agcagcctga catctgagga ctctgcagtc tattactgtg caagatatta tgatgatcat 1200

tactgccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcact ttccgcggac 1260

gatgcgaaaa aggatgctgc gaagaaagat gacgctaaga aagacgatgc taaaaaggac 1320

ctggacattc agctgaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 1380

accatgacct gcagagccag ttcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtca 1440

ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaag tggcttctgg agtcccttat 1500

cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct 1560

gaagatgctg ccacttatta ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttcggtgct 1620

gggaccaagc tggagctgaa agattataag gacgatgatg acaaatagct cgagcgg 1677

<210> 359
<211> 555
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically synthesized

<400> 359

```
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                  10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Asp Asn Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
            100                 105                 110

Asn Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
    130                 135                 140

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
                165                 170                 175

Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
            180                 185                 190

Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
        195                 200                 205
```

```
Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val
225                 230                 235                 240

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp
                245                 250                 255

Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            260                 265                 270

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
        275                 280                 285

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser
    290                 295                 300

Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
305                 310                 315                 320

Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
                325                 330                 335

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
            340                 345                 350

Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
        355                 360                 365

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
    370                 375                 380

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
385                 390                 395                 400

Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
                405                 410                 415

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
            420                 425                 430

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
        435                 440                 445
```

```
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
    450                 455                 460

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
465                 470                 475                 480

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
            500                 505                 510

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
        515                 520                 525

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
    530                 535                 540

Glu Leu Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
545                 550                 555
```

<210> 360
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 360

```
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65                  70                  75                  80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala His Arg

          100
```

<210> 361
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 361

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 362
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 362

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 363
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 363

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 364
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 364

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

 Ala Arg
```

<210> 365
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 365

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
            20                  25                  30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg
```

<210> 366
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 366

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg
```

<210> 367
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 367

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                   10                  15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

Ala Arg

<210> 368
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 368

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
100

<210> 369
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 369

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
                85                  90                  95
```

<210> 370
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 370

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro
                85                  90                  95
```

<210> 371
<211> 100

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 371

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95

Leu Gln Thr Pro
            100
```

<210> 372
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 372

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
                85                  90                  95
```

<210> 373
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 373

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
```

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile Gln Leu Pro
100

<210> 374
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 374

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 375
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 375
ggtataactg gaacgac 17

<210> 376

<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 376
ggtatagtgg gagctactac 20

<210> 377
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 377
gtattactat ggttcgggga gttattataa c 31

<210> 378
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 378
gtattatgat tacgtttggg ggagttatcg ttatacc 37

<210> 379
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 379
gtattactat gatagtagtg gttattacta c 31

<210> 380
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 380
gtattacgat attttgactg gttattataa c 31

<210> 381
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 381
tgactacggt gactac 16

<210> 382
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 382
gtagagatgg ctacaattac 20

<210> 383
<211> 21
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 383
gggtatagca gcagctggta c 21

<210> 384
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 384
gggtatagca gtggctggta c 21

<210> 385
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 385

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 386
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 386

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 387
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 387

Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 388
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 388

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 389
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 389

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 390
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 390

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 391
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 391

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 392
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 392

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 393
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 393

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 394
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 394

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe
            20                  25                  30

Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
    210                 215                 220
```

```
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    370                 375                 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                405                 410                 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            420                 425                 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 395
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 395

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Phe
            20                  25                  30

Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado que se une específicamente a la proteína transmembrana posible GPNMB definida por SEQ ID NO: 289, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 22, una CDR2 de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 24, una CDR3 de cadena pesada definida por SEQ ID NO: 26, una CDR1 de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 31, una CDR2 de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 33 y una CDR3 de cadena ligera definida por SEQ ID NO: 35.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada se define por SEQ ID NO: 20.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la región variable de la cadena ligera se define por SEQ ID NO: 29.

4. El anticuerpo de cualquier reivindicación previa en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5. El anticuerpo de cualquier reivindicación previa en que el anticuerpo se une específicamente a GPNMB con una constante de afinidad superior a 10^7 M^{-1}.

6. El anticuerpo de cualquier reivindicación previa que comprende la región de la línea germinal VH4-3 1.

7. El anticuerpo de la reivindicación 7 que comprende además la región de la línea germinal L2.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende una región derivada de la región de la línea germinal VH4-31.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8 que comprende además una región derivada de la región de la línea germinal L2.

10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

11. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un agente citotóxico.

12. El inmunoconjugado de la reivindicación 11, en el que el agente citotóxico es auristatina E o dolastatina 10 o un derivado de las mismas.

13. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de la reivindicación 11.

14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 10, y un inmunomodulador.

15. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

16. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.

17. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 16.

18. La célula huésped de la reivindicación 17, en la que la célula huésped es una bacteria *E. coli*, una célula de ovario de hámster chino, una célula HeLa o una célula NSO.

19. El ácido nucleico de la reivindicación 15, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19.

20. Un anticuerpo Fv monocatenario que comprende un dominio V_L de un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra GPNMB de la reivindicación 1 o reivindicación 3 ligado a un dominio V_H de dicho anticuerpo dirigido contra GPNMB.

21. El anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 20 que comprende además un dominio V_H de un anticuerpo dirigido contra CD3 ligado a un dominio V_L de dicho anticuerpo dirigido contra CD3.

22. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 20 y un agente citotóxico.

23. El anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 20 ó 21 que comprende además un péptido señal o una marca Flag.

24. El anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 20 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 355.

25. El anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 21 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 o SEQ ID NO: 359.

26. El anticuerpo de la reivindicación 10, el inmunoconjugado de las reivindicaciones 11, 12 ó 22 o el anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 20 para uso como medicamento.

27. El anticuerpo de la reivindicación 10, el inmunoconjugado de las reivindicaciones 11, 12 ó 22 o el anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 20 para el tratamiento de melanoma o una neoplasia del sistema SNC.

28. El anticuerpo, inmunoconjugado o anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 27, en el que dicha neoplasia del sistema SNC es astrocitoma, glioblastoma, meduloblastoma o meningitis neoplásica.

29. El anticuerpo, inmunoconjugado o anticuerpo Fv monocatenario de la reivindicación 26, en el que el medicamento es para el tratamiento de un paciente humano.

30. El inmunoconjugado de la reivindicación 26, en el que el medicamento se usa como una dosis unitaria entre 0,1 mg/kg y 10 mg/ kg, con 2 a 4 administraciones.

31. El inmunoconjugado de la reivindicación 30, en el que la dosis unitaria está entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg.

32. El inmunoconjugado de la reivindicación 31, en el que la dosis unitaria es aproximadamente 1 mg/kg.

Figura 1

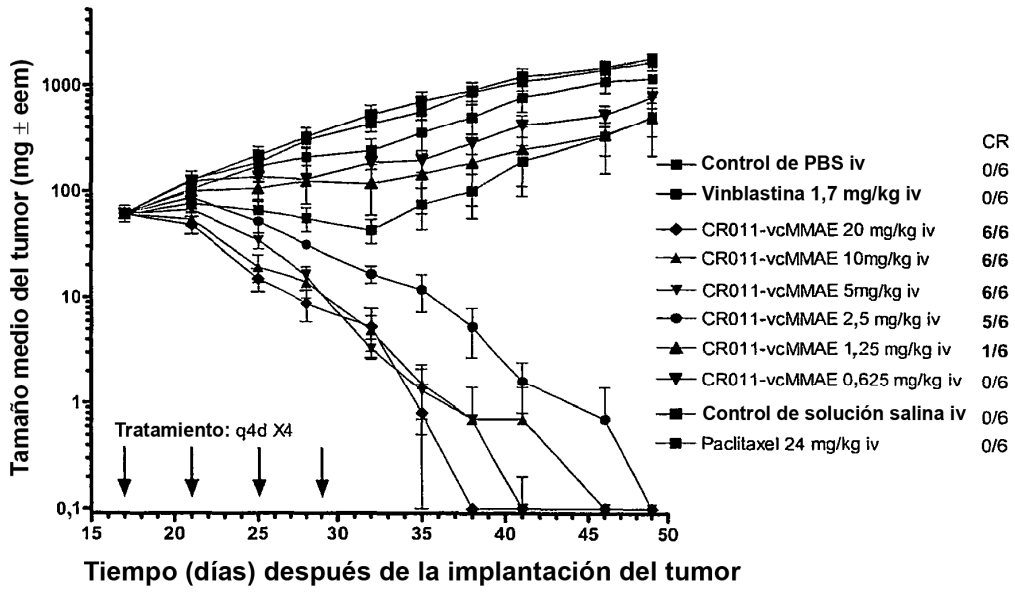
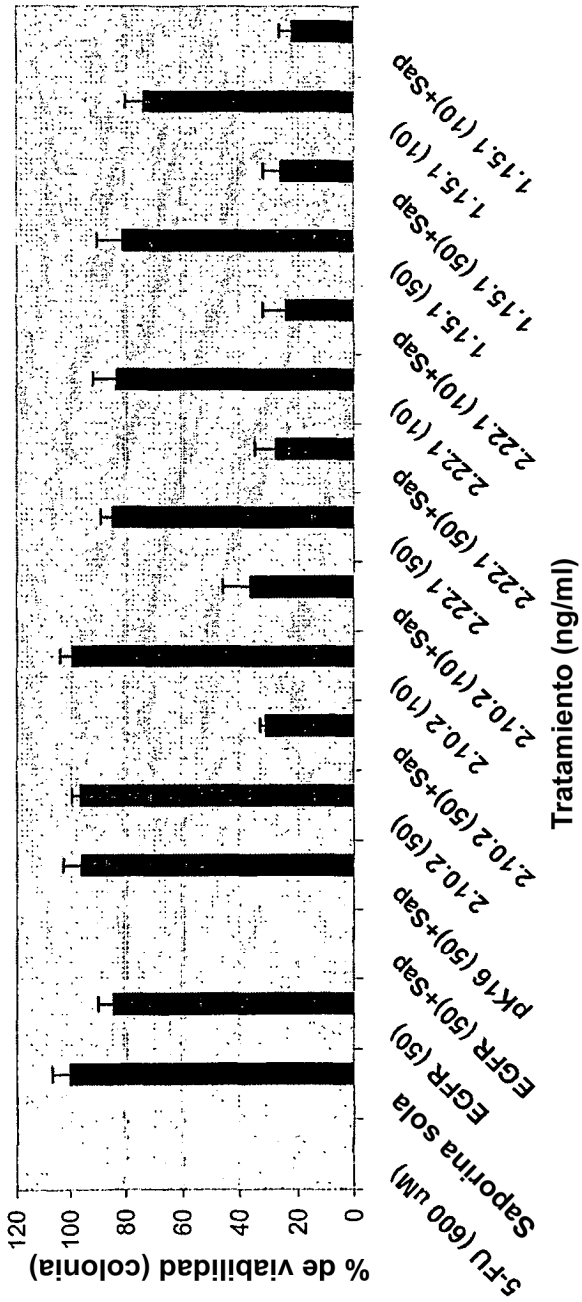

Tamaño medio del tumor (mg ± eem)
1000
100
10
1
0,1
Tratamiento: q4d X4
15
20
25
30
35
40
45
50
Tiempo (días) después de la implantación del tumor
CR
Control de PBS iv 0/6
Vinblastina 1,7 mg/kg iv 0/6
CR011-vcMMAE 20 mg/kg iv 6/6
CR011-vcMMAE 10mg/kg iv 6/6
CR011-vcMMAE 5mg/kg iv 6/6
CR011-vcMMAE 2,5 mg/kg iv 5/6
CR011-vcMMAE 1,25 mg/kg iv 1/6
CR011-vcMMAE 0,625 mg/kg iv 0/6
Control de solución salina iv 0/6
Paclitaxel 24 mg/kg iv 0/6

Figura 2


% de viabilidad (colonia)
120
100
80
60
40
20
0
5-FU (600 uM)
Saporina sola
EGFR (50)
EGFR (50)+Sap
pK16 (50)+Sap
2.10.2 (50)
2.10.2 (50)+Sap
2.10.2 (10)
2.10.2 (10)+Sap
2.22.1 (50)
2.22.1 (50)+Sap
2.22.1 (10)
2.22.1 (10)+Sap
1.15.1 (50)
1.15.1 (50)+Sap
1.15.1 (10)
1.15.1 (10)+Sap
Tratamiento (ng/ml)

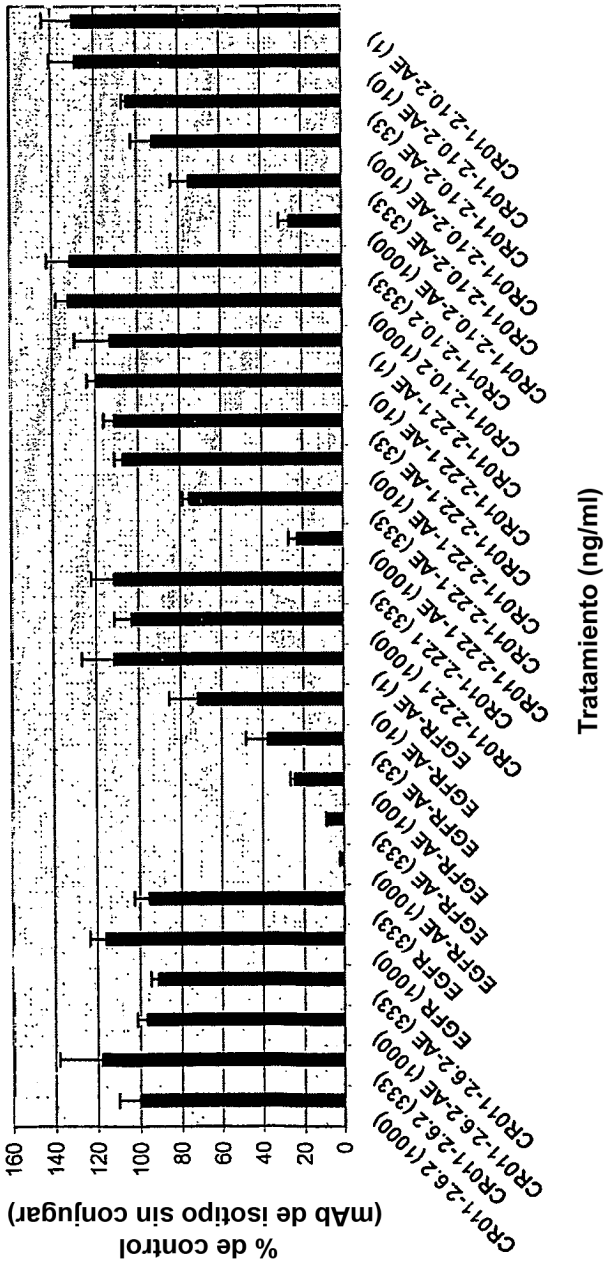

% de control
(mAb de isotipo sin conjugar)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Tratamiento (ng/ml)
CR011-2.6.2 (1000)
CR011-2.6.2 (333)
CR011-2.6.2-AE (1000)
EGFR (333)
EGFR (1000)
EGFR-AE (333)
EGFR-AE (1000)
EGFR-AE (100)
EGFR-AE (33)
EGFR-AE (10)
EGFR-AE (1)
CR011-2.22.1 (1000)
CR011-2.22.1 (333)
CR011-2.22.1-AE (1000)
CR011-2.22.1-AE (333)
CR011-2.22.1-AE (100)
CR011-2.22.1-AE (33)
CR011-2.22.1-AE (10)
CR011-2.10.2-AE (1)
CR011-2.10.2 (1000)
CR011-2.10.2 (333)
CR011-2.10.2-AE (1000)
CR011-2.10.2-AE (333)
CR011-2.10.2-AE (100)
CR011-2.10.2-AE (33)
CR011-2.10.2-AE (10)
CR011-2.10.2-AE (1)

Figura 3

Figura 4

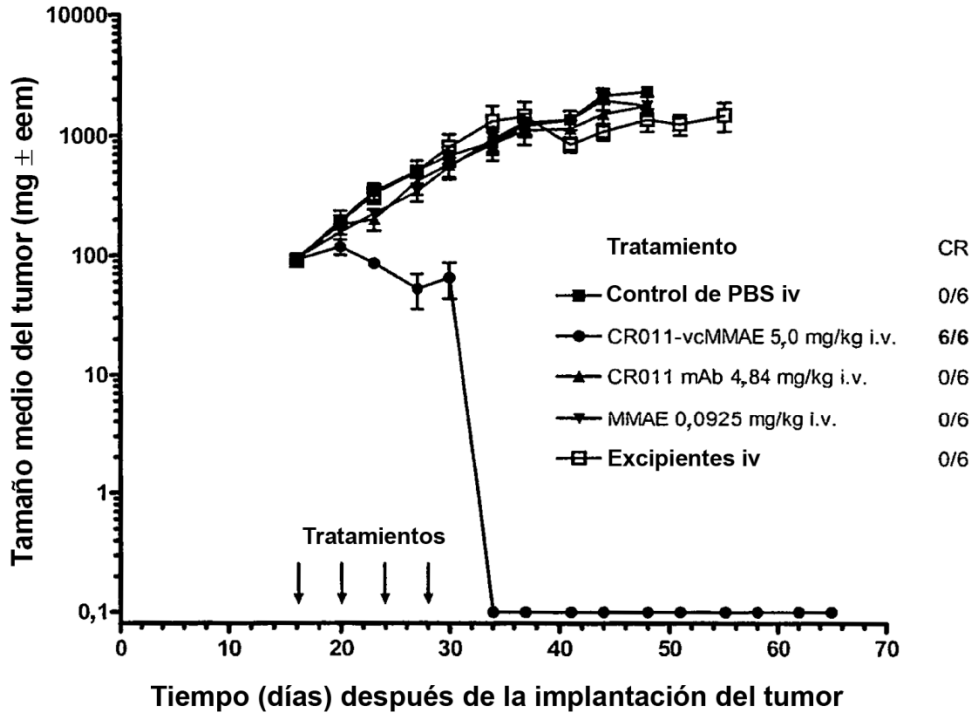


Figura 5

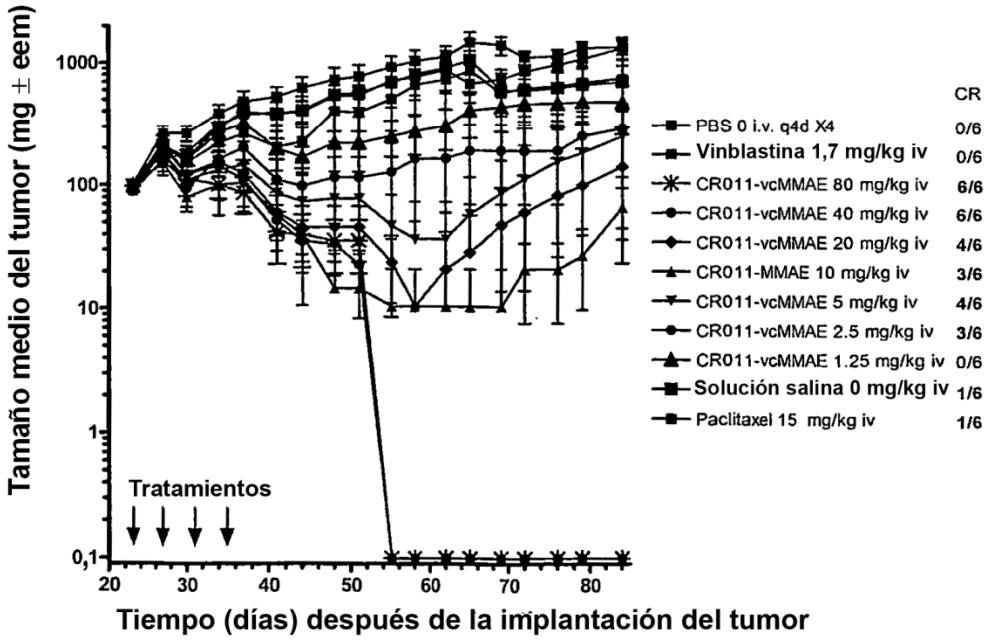


Figura 6

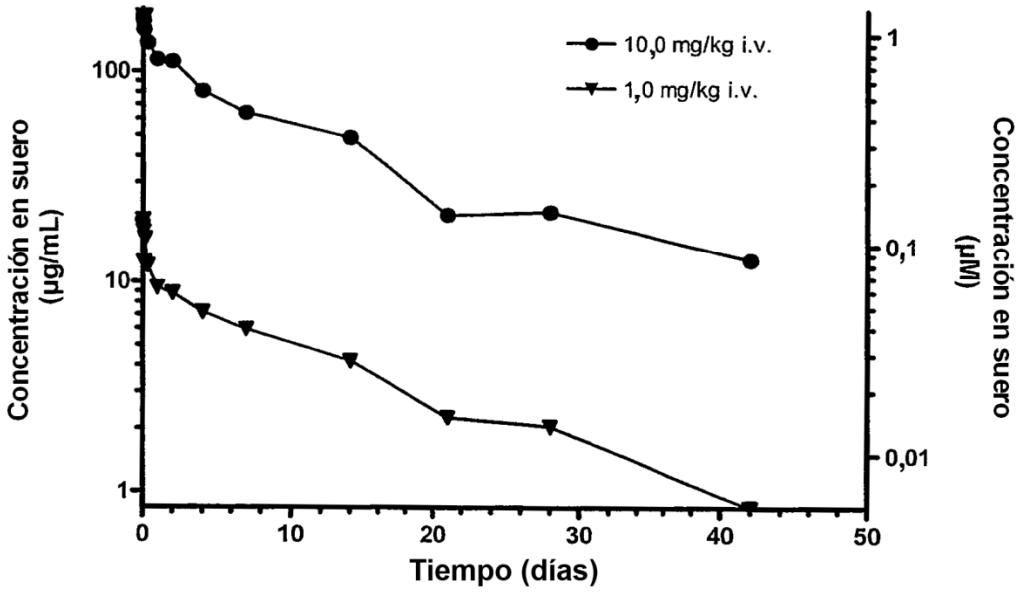

10,0 mg/kg i.v.
1,0 mg/kg i.v.
Concentración en suero (µg/mL)
Concentración en suero (µM)
Tiempo (días)
100
10
1
0
10
20
30
40
50
1
0,1
0,01

Figura 7

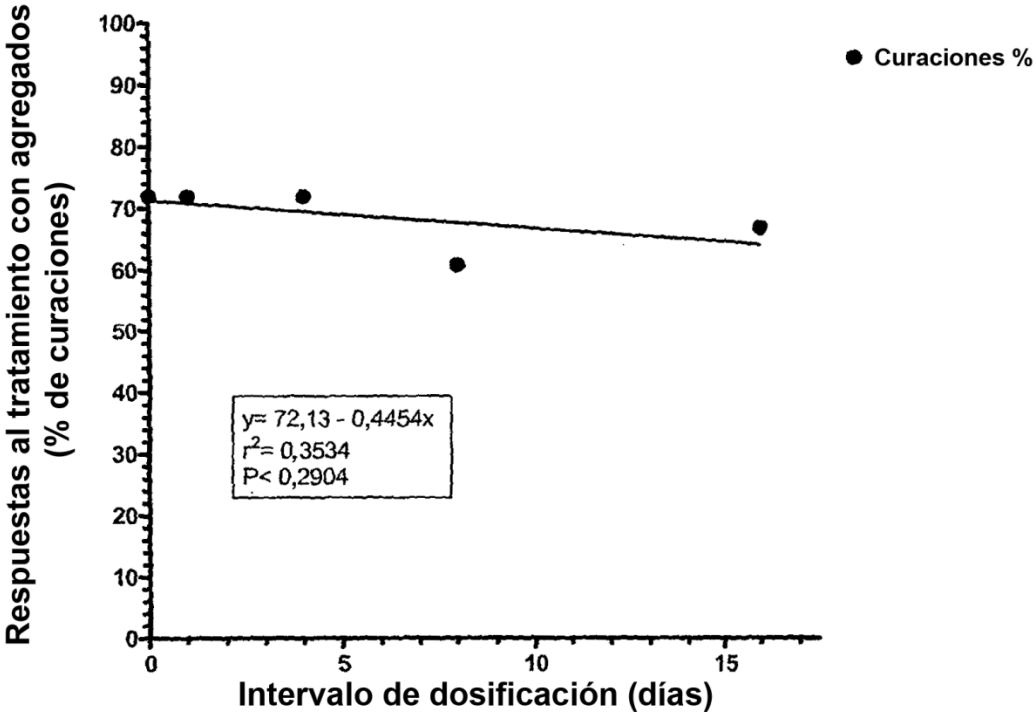

Respuestas al tratamiento con agregados (% de curaciones)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
Intervalo de dosificación (días)
y= 72,13 - 0,4454x
r2= 0,3534
P< 0,2904
Curaciones %

Figura 8

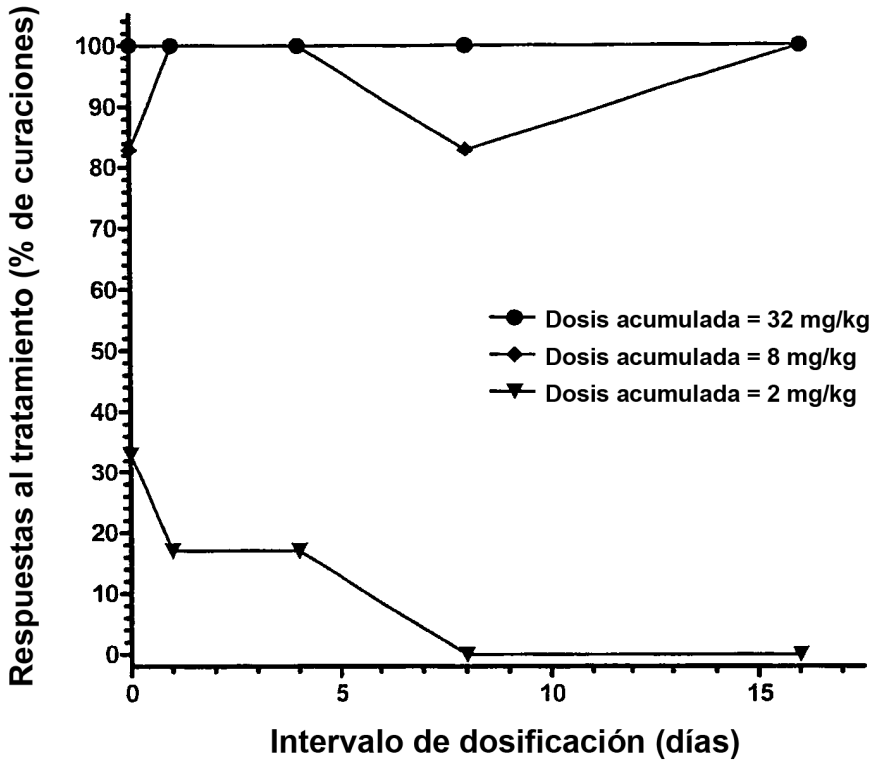
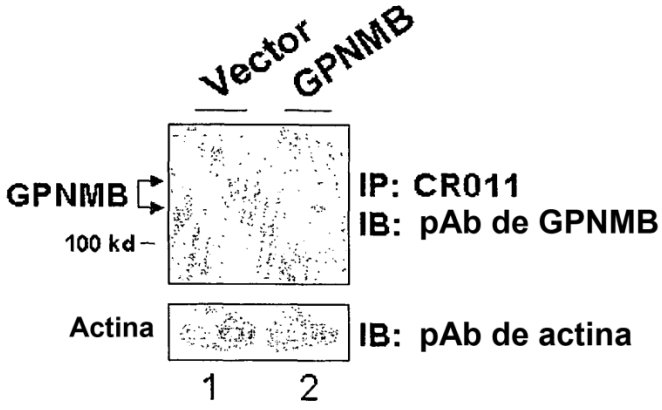
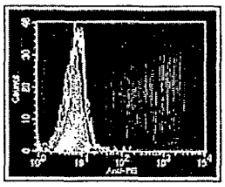

Respuestas al tratamiento (% de curaciones)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
Intervalo de dosificación (días)
Dosis acumulada = 32 mg/kg
Dosis acumulada = 8 mg/kg
Dosis acumulada = 2 mg/kg

Figura 9

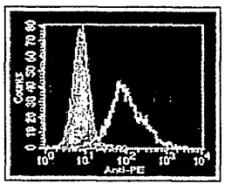
A.



B



vector



GPNMB

	Media geométrica	
	Vector	GPNMB
Ab secundario-PE solo (relleno)	5,86	7,69
IgG_2 + Ab secundario-PE (línea de puntos)	7,96	8,63
CR011 + Ab secundario-PE (línea continua)	7,44	90,38

C

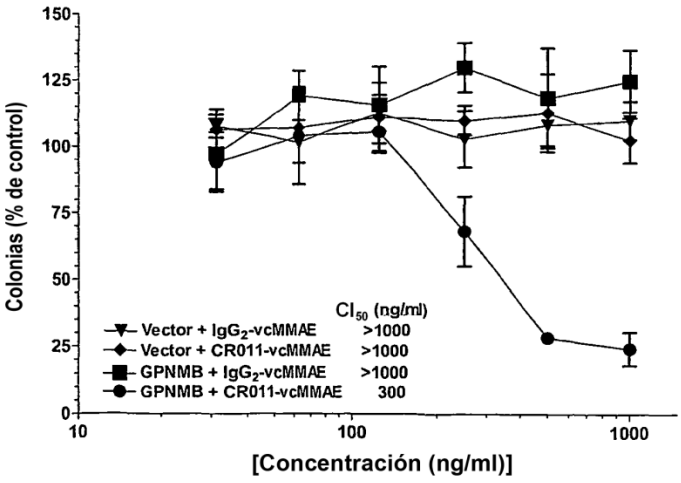
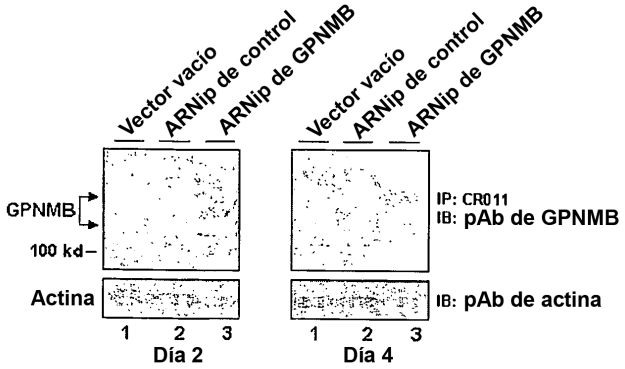
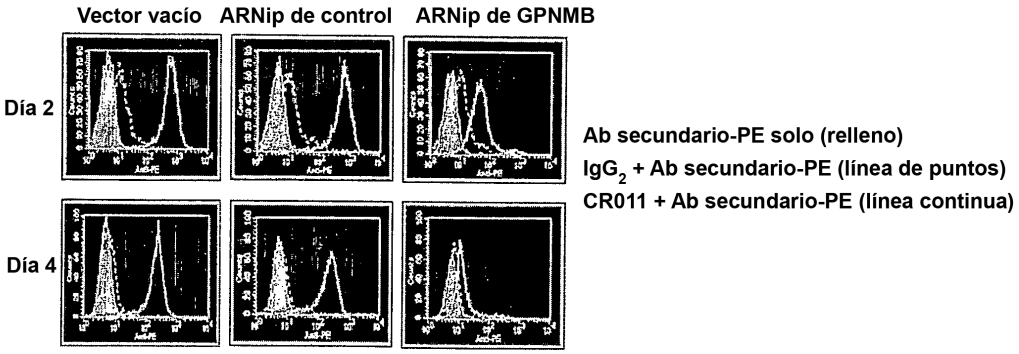


Figura 10

A



B



C

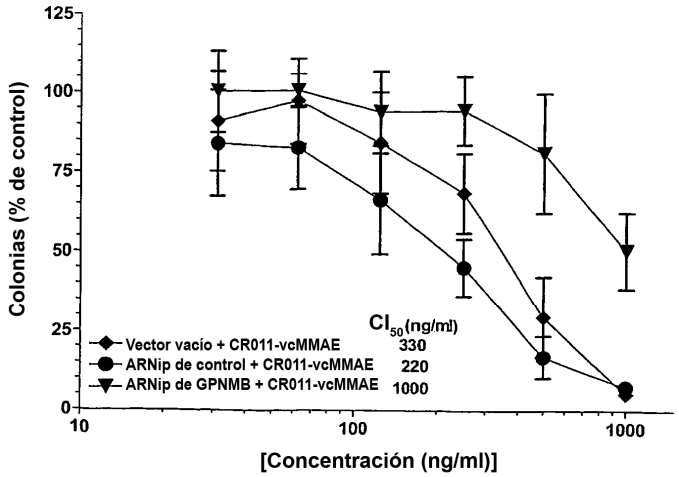


Figura 11

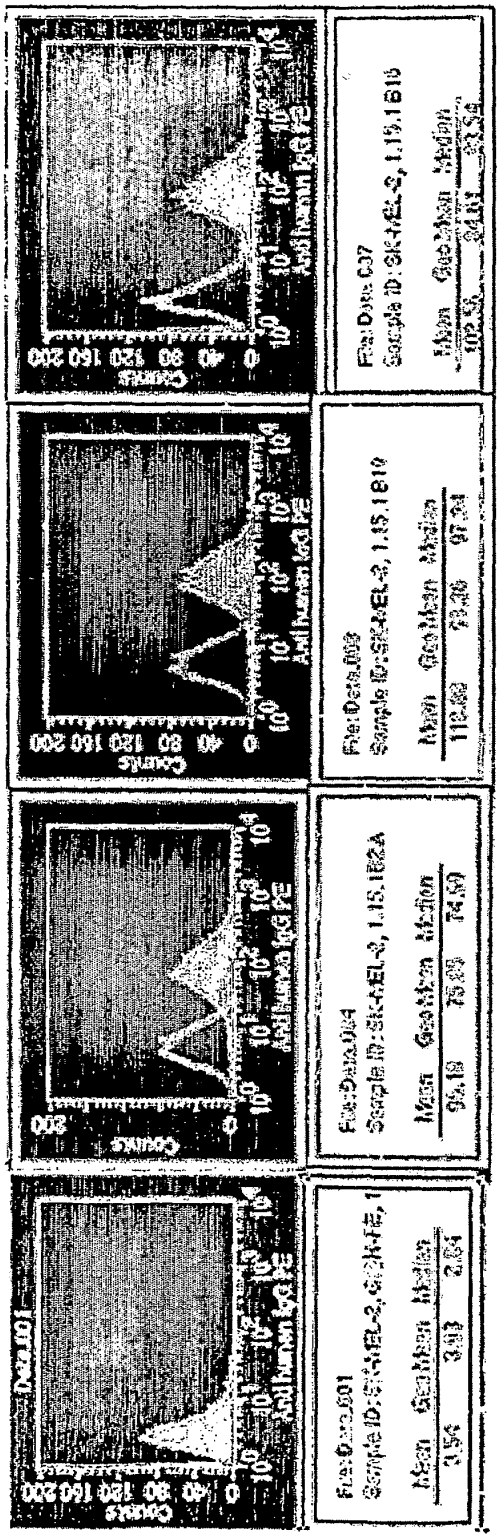
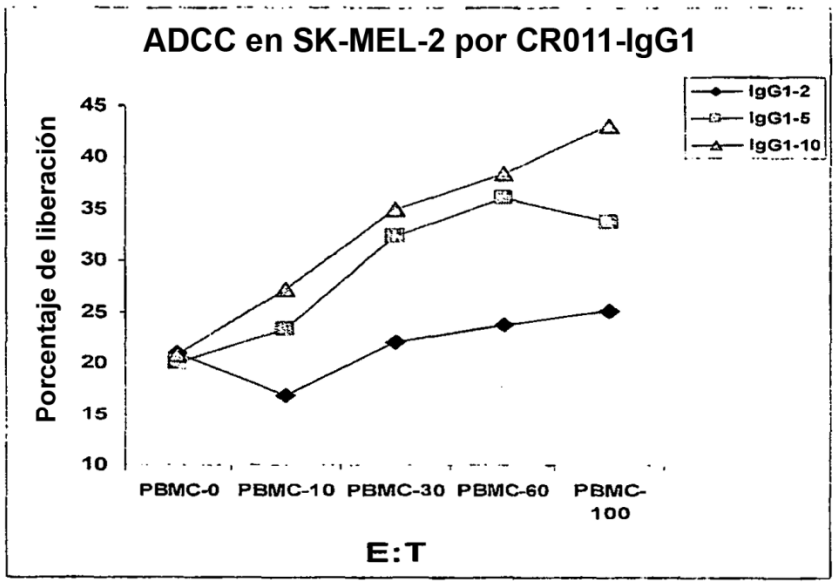

Control
B2: G2, híbrido
B19: G2, Recomb
B16: G2, Recomb
GMFR:
35
32
28

Figura 12

A.


ADCC en SK-MEL-2 por CR011-IgG1
IgG1-2
IgG1-5
IgG1-10
Porcentaje de liberación
45
40
35
30
25
20
15
10
PBMC-0
PBMC-10
PBMC-30
PBMC-60
PBMC-100
E:T

B.

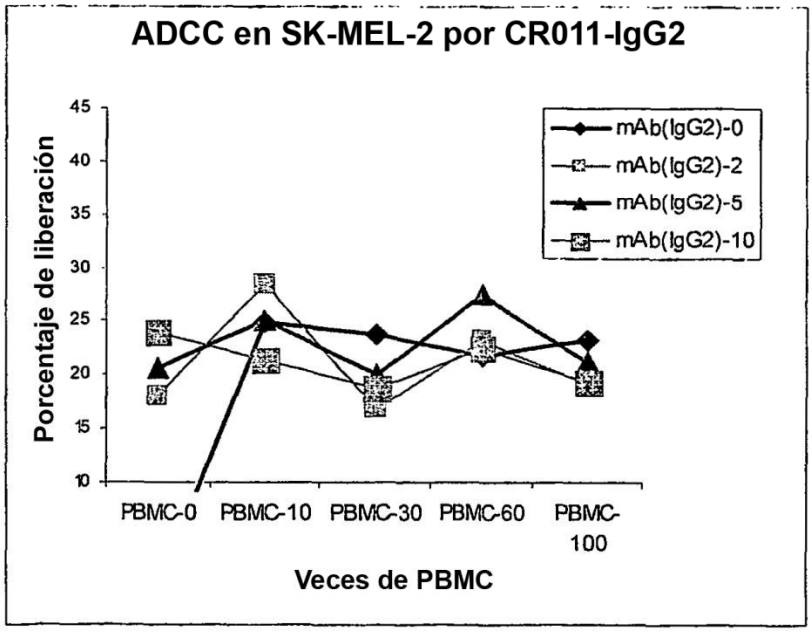
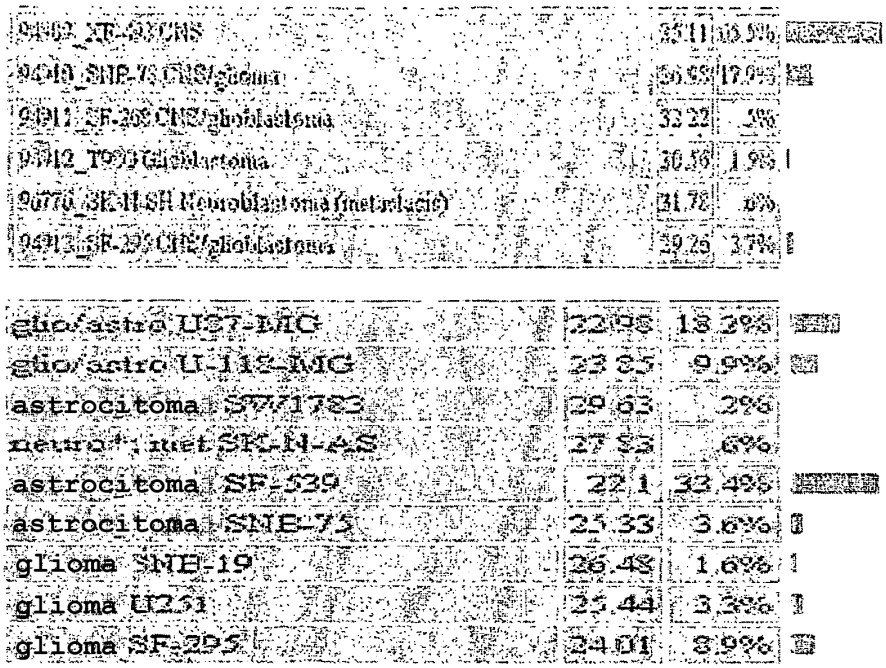

ADCC en SK-MEL-2 por CR011-IgG2
mAb(IgG2)-0
mAb(IgG2)-2
mAb(IgG2)-5
mAb(IgG2)-10
Porcentaje de liberación
45
40
35
30
25
20
15
10
PBMC-0
PBMC-10
PBMC-30
PBMC-60
PBMC-100
Veces de PBMC

Figura 13

A.


astrocitoma SF-539 22.1 33.4%
astrocitoma SNB-75 25.33 3.6%
glioma SNB-19 26.48 1.6%
glioma U251 25.44 3.3%
glioma SF-295 24.01 8.9%

B.

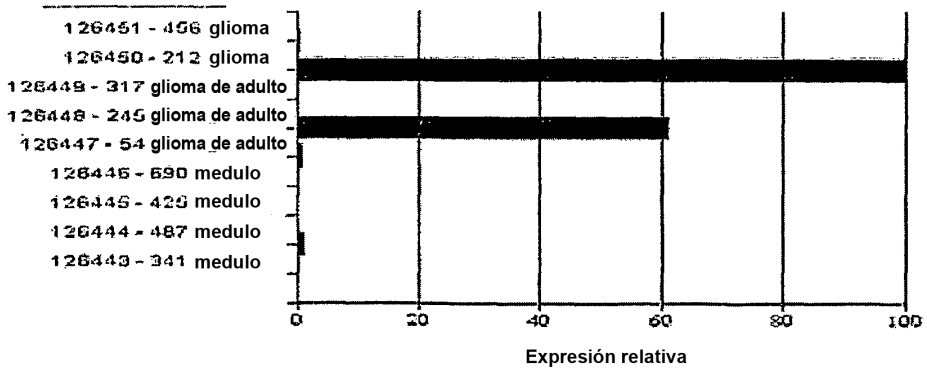

126451 - 496 glioma
126450 - 212 glioma
126449 - 317 glioma de adulto
126448 - 245 glioma de adulto
126447 - 54 glioma de adulto
126446 - 690 medulo
126445 - 426 medulo
126444 - 487 medulo
126443 - 341 medulo
0
20
40
60
80
100
Expresión relativa

Figura 13

C

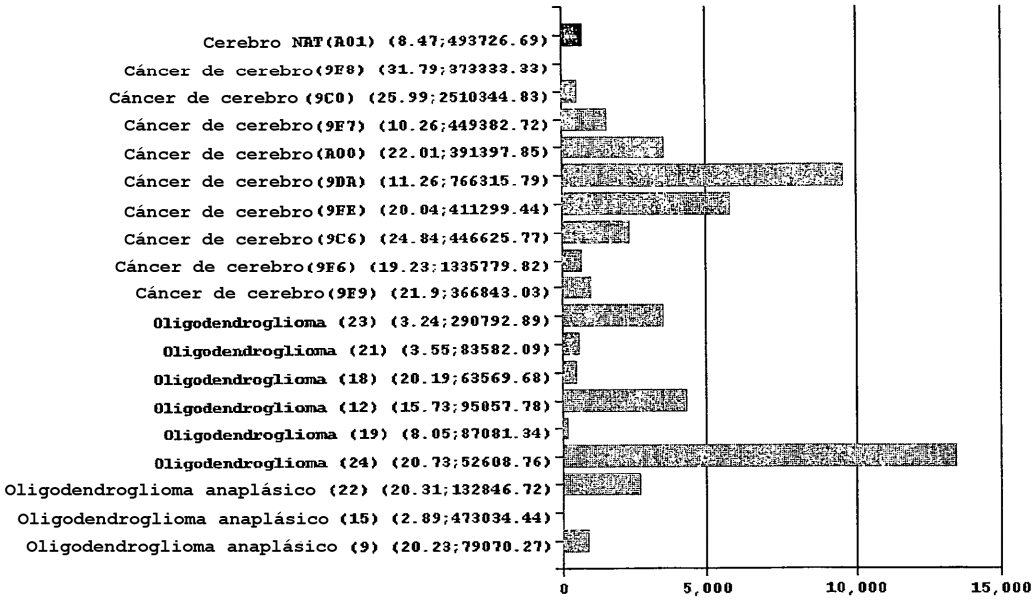
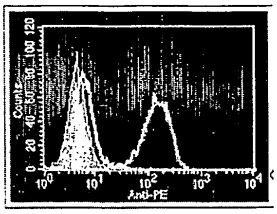

Cerebro NAT(A01) (8.47;493726.69)
Cáncer de cerebro(9F8) (31.79;373333.33)
Cáncer de cerebro(9C0) (25.99;2510344.83)
Cáncer de cerebro(9F7) (10.26;449382.72)
Cáncer de cerebro(A00) (22.01;391397.85)
Cáncer de cerebro(9DA) (11.26;766315.79)
Cáncer de cerebro(9FE) (20.04;411299.44)
Cáncer de cerebro(9C6) (24.84;446625.77)
Cáncer de cerebro(9F6) (19.23;1335779.82)
Cáncer de cerebro(9F9) (21.9;366843.03)
Oligodendroglioma (23) (3.24;290792.89)
Oligodendroglioma (21) (3.55;83582.09)
Oligodendroglioma (18) (20.19;63569.68)
Oligodendroglioma (12) (15.73;95057.78)
Oligodendroglioma (19) (8.05;87081.34)
Oligodendroglioma (24) (20.73;52608.76)
Oligodendroglioma anaplásico (22) (20.31;132846.72)
Oligodendroglioma anaplásico (15) (2.89;473034.44)
Oligodendroglioma anaplásico (9) (20.23;79070.27)
0
5,000
10,000
15,000

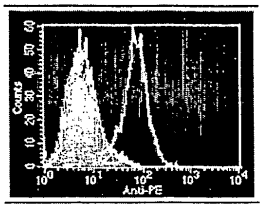
Figura 14

SK-MEL-2



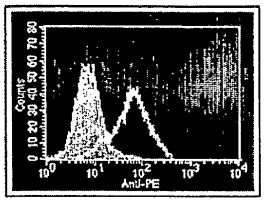
Púrpura = PE dirigida contra IgG humana
Verde = IgG2
Rosa= 1.15.1
Desplazamiento de 21,4 veces

XF-498



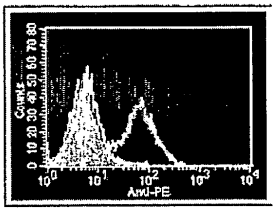
Púrpura = PE dirigida contra IgG humana
Verde = IgG2
Rosa= 1.15.1
Desplazamiento de 10 veces

U-118-MG



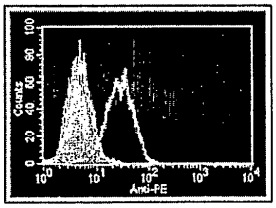
Púrpura = PE dirigida contra IgG humana
Verde = IgG2
Rosa= 1.15.1
Desplazamiento de 7,4 veces

SNB-78



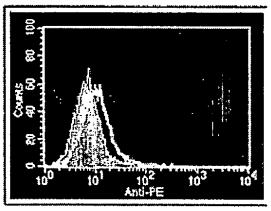
Púrpura = PE dirigida contra IgG humana
Verde = IgG2
Rosa= 1.15.1
Desplazamiento de 8,6 veces

SF-539



Púrpura = PE dirigida contra IgG humana
Verde = IgG2
Rosa= 1.15.1
Desplazamiento de 5,4 veces

SF-268



Púrpura = IgG2
Verde = 1.15.1

Desplazamiento de 1,5 veces

Figura 15

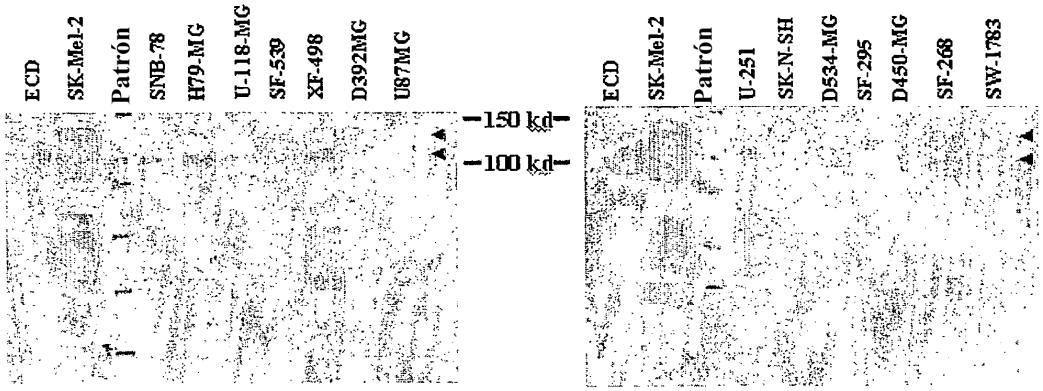

ECD
SK-Mel-2
Patrón
SNB-78
H79-MG
U-118-MG
SF-539
XF-498
D392MG
U87MG
150 kd
100 kd
ECD
SK-Mel-2
Patrón
U-251
SK-N-SH
D534-MG
SF-295
D450-MG
SF-268
SW-1783

Figura 16

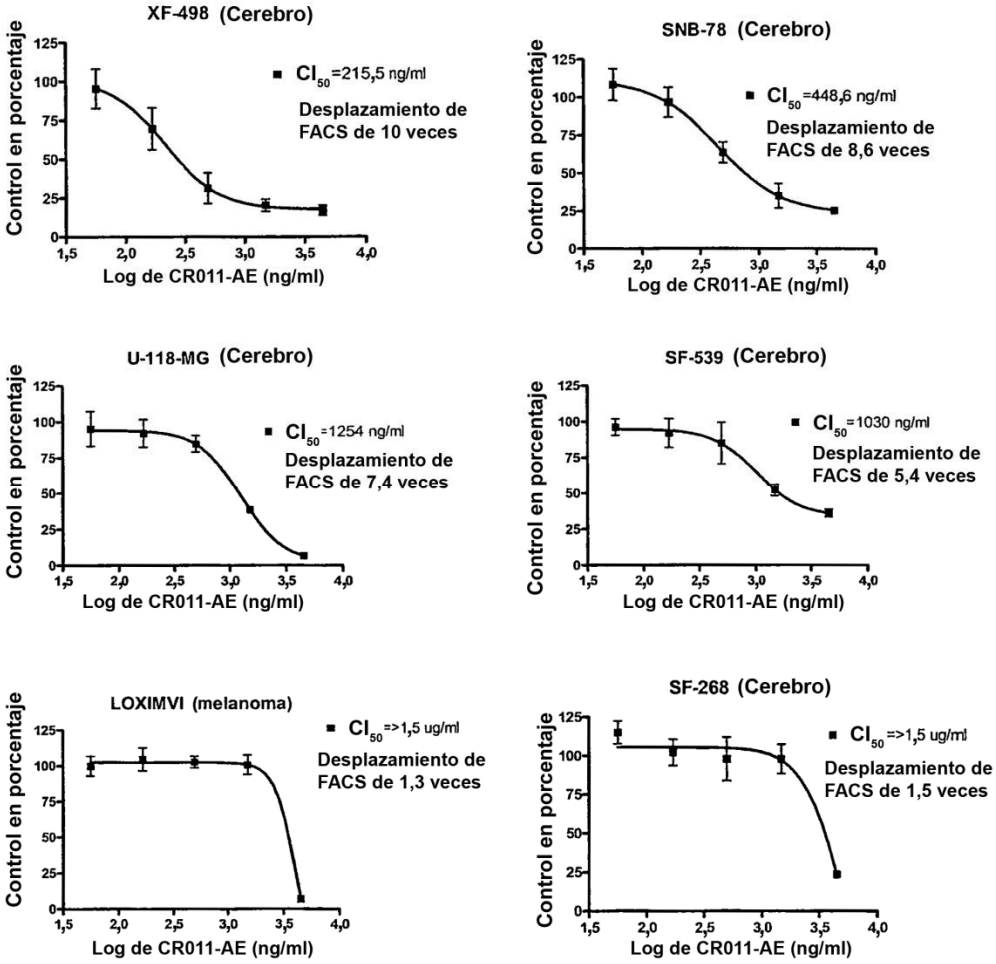

XF-498 (Cerebro)
Control en porcentaje
Log de CR011-AE (ng/ml)
CI50=215,5 ng/ml
Desplazamiento de FACS de 10 veces
SNB-78 (Cerebro)
CI50=448,6 ng/ml
Desplazamiento de FACS de 8,6 veces
U-118-MG (Cerebro)
CI50=1254 ng/ml
Desplazamiento de FACS de 7,4 veces
SF-539 (Cerebro)
CI50=1030 ng/ml
Desplazamiento de FACS de 5,4 veces
LOXIMVI (melanoma)
CI50=>1,5 ug/ml
Desplazamiento de FACS de 1,3 veces
SF-268 (Cerebro)
CI50=>1,5 ug/ml
Desplazamiento de FACS de 1,5 veces

Figura 17

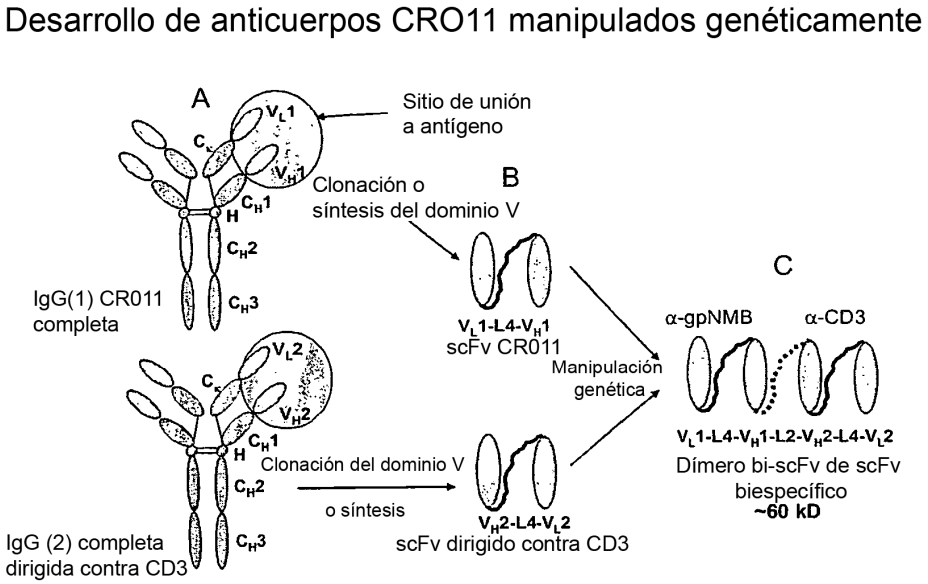
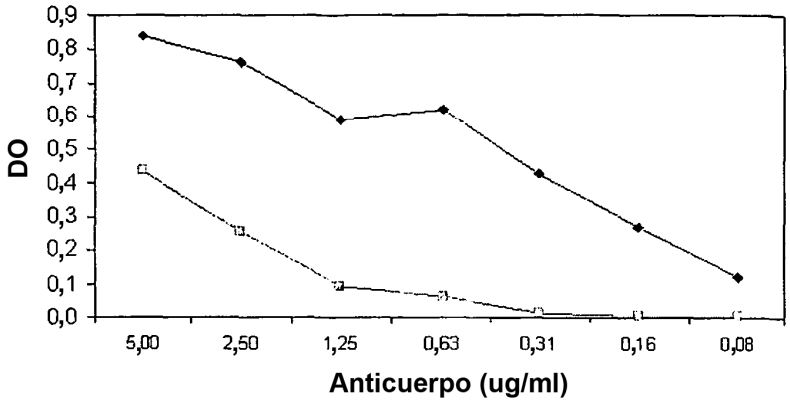

Desarrollo de anticuerpos CRO11 manipulados genéticamente
A
Sitio de unión a antígeno
Clonación o síntesis del dominio V
B
C
IgG(1) CR011 completa
scFv CR011
α-gpNMB
α-CD3
Manipulación genética
Clonación del dominio V
o síntesis
IgG (2) completa dirigida contra CD3
scFv dirigido contra CD3
Dímero bi-scFv de scFv biespecífico
~60 kD

Figura 18

A


DO
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
5,00
2,50
1,25
0,63
0,31
0,16
0,08
Anticuerpo (ug/ml)

B

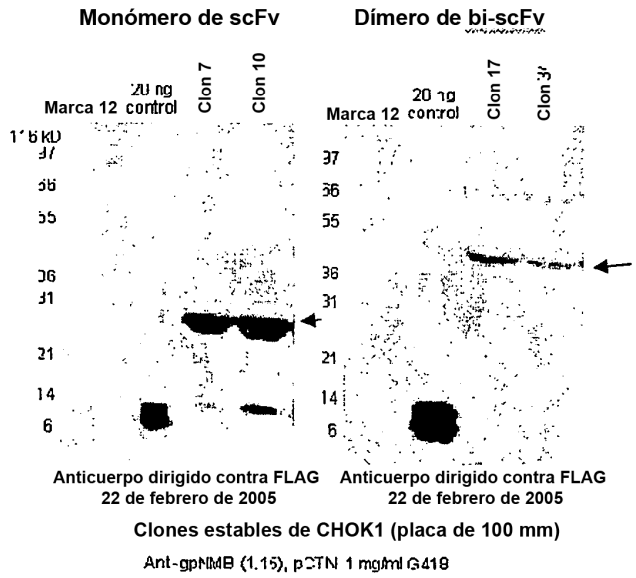

Monómero de scFv
Dímero de bi-scFv
Marca 12
control
Clon 7
Clon 10
Clon 17
Anticuerpo dirigido contra FLAG
22 de febrero de 2005
Clones estables de CHOK1 (placa de 100 mm)
Ant-gpNMB (1.15), pCTN 1 mg/ml G418

Figura 19

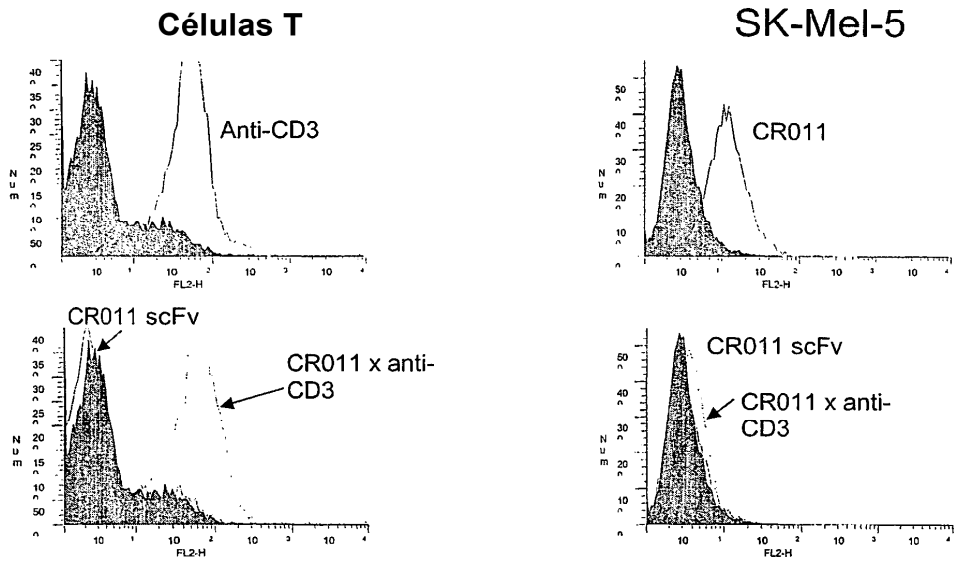

Células T
SK-Mel-5
Anti-CD3
CR011
CR011 scFv
CR011 x anti-CD3
CR011 scFv
CR011 x anti-CD3
FL2-H
FL2-H
FL2-H
FL2-H

Figura 20

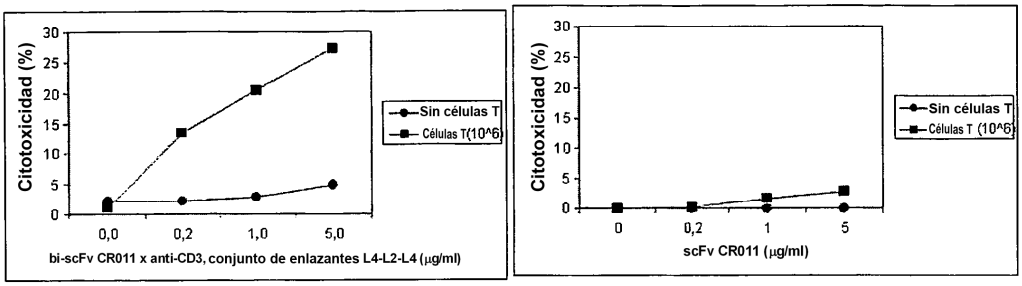


Figura 21

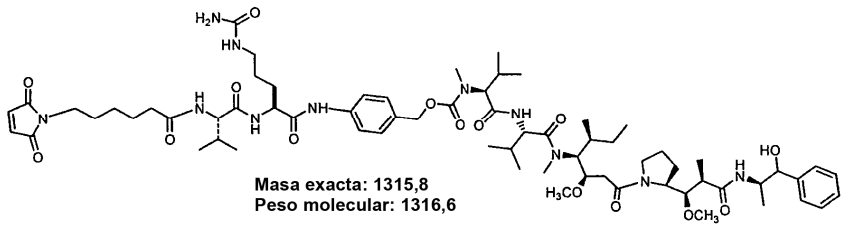


Figura 22

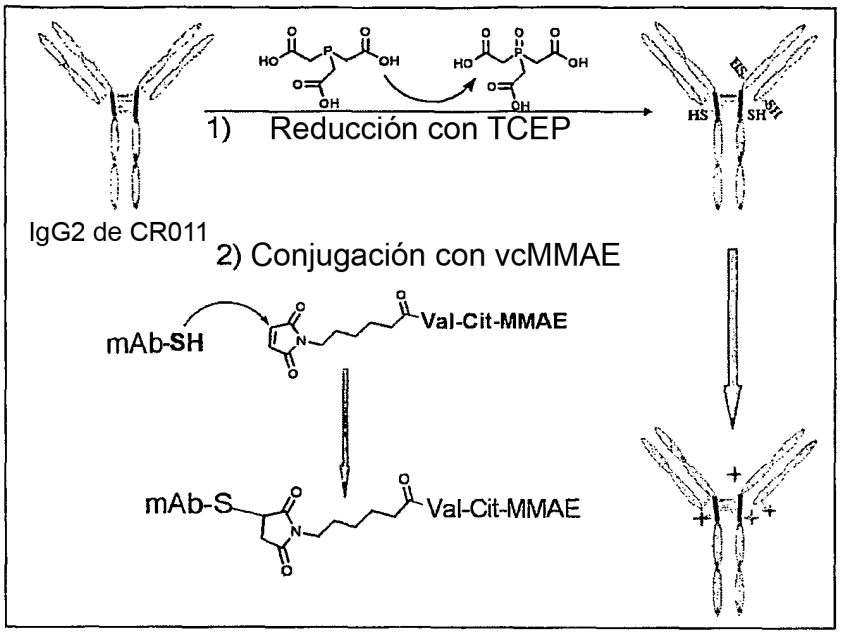

1) Reducción con TCEP
IgG2 de CR011
2) Conjugación con vcMMAE
mAb-SH
Val-Cit-MMAE
mAb-S
Val-Cit-MMAE

Figura 23

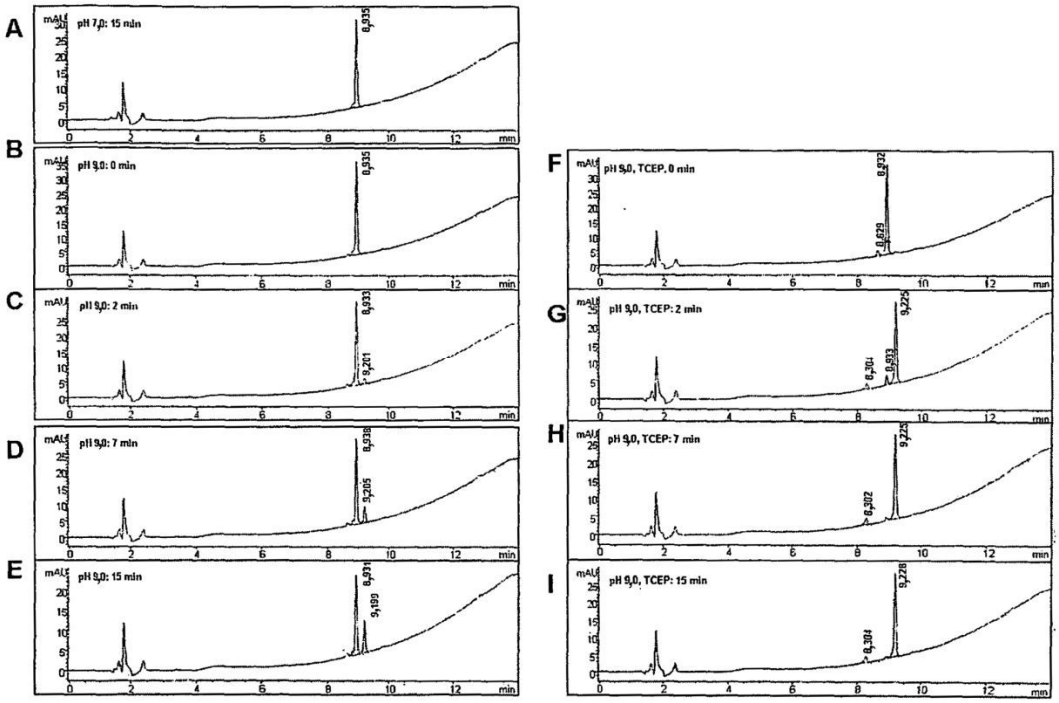

A
pH 7,0: 15 min
8,935
B
pH 9,0: 0 min
8,935
C
pH 9,0: 2 min
8,933
9,201
D
pH 9,0: 7 min
8,938
9,205
E
pH 9,0: 15 min
8,931
9,199
F
pH 9,0, TCEP, 0 min
8,922
8,629
G
pH 9,0, TCEP: 2 min
9,225
8,301
8,933
H
pH 9,0, TCEP: 7 min
9,225
8,302
I
pH 9,0, TCEP: 15 min
9,228
8,304
0
2
4
6
8
10
12
min

Figura 24

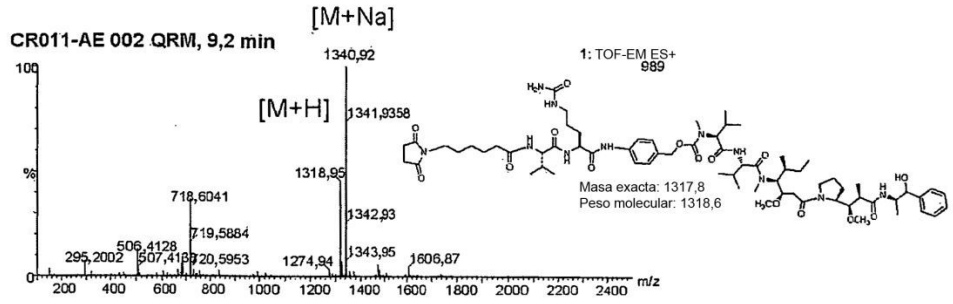
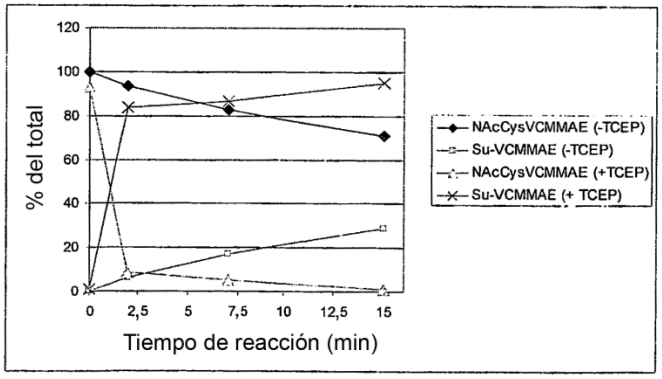



Figura 25